

Impacto de manejos agronómicos de largo plazo sobre la estructura y función microbiana en suelos del noroeste bonaerense

Tesis para acceder al grado de Doctor de la Universidad de Buenos Aires, Área Ciencias Agropecuarias

Oksana Sydorenko

Ingeniera Agrónoma - Universidad de Buenos Aires - 2010

Cátedra de Microbiología Agrícola-INBA. FAUBA-CONICET



FAUBA

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

Marcelo Abel Soria

Licenciado en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctor, área Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Co-director

Marcela Susana Montecchia

Licenciada en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctora, área Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Consejero de Estudios

Olga Susana Correa

Ingeniera Agrónoma (Universidad de Buenos Aires)

Magister Scientiae (Universidad de Buenos Aires)

JURADO DE TESIS

Dr. José Manuel Meriles

Dra. Fernanda Covacevich

Dra. Eva Lucía Margarita Figuerola

Fecha de defensa de la tesis: 29-03-2017

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi comité, a la Cátedra de Microbiología Agrícola, al INBA CONICET-UBA, a la EEA. INTA Gral. Villegas, a mi familia, mi pareja, mis amigos y a todos los doctorandos y becarios.

AGRADECIMIENTOS

A todo mi comité: mi director Marcelo Soria, mi co-directora Marcela Montecchia y mi consejera de tesis Olga Correa; este gran equipo ha estado en todos los momentos, desde las tomas de grandes decisiones y hasta en los detalles más mínimos del presente trabajo. De ustedes recibí muchísimo aprendizaje, apoyo y motivación.

A Olga Correa, particularmente, que me ha guiado en los avances laborales, con la financiación de los experimentos y un seguimiento de todos los detalles de mi trabajo.

A la Cátedra de Microbiología Agrícola e INBA que me proporcionaron el lugar, el equipamiento y materiales para trabajar.

A UBACyT 20020130100286BA y 20020100100767 que fueron la base de la financiación de los viajes, ensayos y presentaciones en congresos de este trabajo.

A CONICET que con otorgarme la beca permitió que este trabajo y estudios sean factibles.

A FAUBA que me otorgó un cargo exclusivo, lo cual permitió que me pueda seguir dedicando exclusivamente al trabajo de tesis por un año más.

A la escuela para graduados Ing. Agr. Alberto Soriano, que es donde realicé los estudios de doctorado.

Al INTA Gral. Villegas que no solo son los que llevan a cabo el experimento de larga duración en el que realicé mis estudios, sino también siempre me recibieron con tanta atención y ayuda cuando fui a extraer las muestras. Especialmente a Mirian Barraco.

A los que me ayudaron con los ensayos, toma y procesamiento de las muestras: Fernanda Berti, Micaela Tosi, Agustín Martínez, Juan Orlowski, Damian Ortiz, Jimena Vogrig.

A los que me ayudaron con la compaginación e impresión de este trabajo: Mariela Echeverría, Florencia Galotta, Eliana Wassermann y Federico Spagnoletti.

A mis amigos de la cátedra, con los cuales compartimos muchas horas de trabajo y otras tantas de diversión.

A mi familia, mis padres, mi hermano y mi cuñada y por sobre todo a mis hermosos sobrinos Mili y Joaquín que se bancaron tantas ausencias mías, entendiendo la importancia de este doctorado para mí.

A mi pareja Juan con el que compartimos todo en el trabajo, en el hogar y en los viajes.

ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria	v
Agradecimientos	vii
Índice general	ix
Índice de cuadros	xi
Índice de figuras	xii
Abreviaturas	xiii
Resumen	xv
Abstract	xvii
Capítulo 1: Introducción	1
1.1. Descripción del problema y antecedentes	3
1.2. Objetivos, hipótesis y predicciones	10
Capítulo 2: Materiales y métodos	13
2.1. Diseño del experimento y toma de muestras	15
2.2. Análisis físico-químicos	16
2.3. Rendimientos de los cultivos	16
2.4. Estructura genética de las comunidades bacterianas	17
2.4.1. Extracción de ADN del suelo y cuantificación	17
2.4.2. Amplificación y análisis por DGGE de los genes 16S rARN	17
2.4.3. Cuantificación del gen 16S rARN por PCR cuantitativa (qPCR) en las muestras de suelo	18
2.5. Perfiles fisiológicos de la comunidad microbiana del suelo	19
2.6. Actividad microbiana del suelo	20
2.7. Cuantificación de genes funcionales <i>nir</i> por qPCR	20
2.8. Modelos de predicción para los genes funcionales <i>nir</i>	21
2.9. Detalles de análisis estadísticos con modelos de efectos mixtos	22
Capítulo 3: Resultados	25
3.1. Parámetros de fertilidad físico-química	27
3.2. Rendimientos de los cultivos	29
3.3. Estructura genética de las comunidades bacterianas	30
3.3.1. Perfiles genéticos bacterianos	30
3.3.2. Índices de biodiversidad derivados de los perfiles de DGGE	32
3.3.3. Cuantificación del número de copias del 16S rRNA	35
3.4. Consumo de sustratos carbonados por las comunidades microbianas del suelo	36
3.4.1. Perfiles fisiológicos del consumo de sustratos carbonados	36
3.4.2. Índices de biodiversidad a partir del consumo de sustratos carbonados	40
3.4.3. Actividad microbiana derivada del consumo de sustratos carbonados	42
3.5. Actividad microbiana del suelo	43
3.5.1. Actividad hidrolítica	43
3.5.2. Descomposición de rastrojo	44
3.6. Genes funcionales de desnitrificación	45
3.6.1. Estructura de genes que codifican la enzima nitrito reductasa (<i>nirK</i> y <i>nirS</i>)	45
3.6.2. Modelos de predicción para los genes <i>nirK</i> y <i>nirS</i>	48

Capítulo 4: Discusión	49
4.1. Los manejos agronómicos afectan los parámetros físico-químicos en experimentos de larga duración.....	51
4.2. Los rendimientos de los cultivos responden a la fertilización y mostraron una marcada dependencia climática.....	54
4.3. La estructura de la comunidad bacteriana se modifica con el tipo de laboreo y el momento del ciclo agronómico	55
4.4. El momento del ciclo agronómico, pero no el laboreo, modifica la diversidad funcional microbiana medida por el consumo de sustratos carbonados.....	58
4.5. El laboreo del suelo modifica la actividad microbiana	60
4.6. Los tipos de laboreo producen cambios en la estructura de la comunidad de desnitrificadores	61
4.7. Consideraciones finales.....	63
Capítulo 5: Conclusiones	65
Capítulo 6: Referencias bibliográficas	69
Apéndice 1: Ejemplos de análisis estadísticos con modelos de efectos mixtos ..	81
Apéndice 2: Ejemplos de imágenes de los geles de DGGE bacteriano.....	87

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Cebadores utilizados y los protocolos de la PCR en tiempo real para la cuantificación del número de copias de los genes <i>nirK</i> y <i>nirS</i>	21
Cuadro 2: Diseño genérico de los modelos de efectos mixtos en <i>R software</i>	23
Cuadro 3: Contenidos de arcilla, arena y limo en suelos con siembra directa, labranza vertical y labranza convencional.....	27
Cuadro 4: Valores de pH y fósforo extractable en suelos sin y con fertilización	27
Cuadro 5: Contenidos de materia orgánica, nitrógeno total y la relación entre carbono y nitrógeno en suelos con siembra directa, labranza vertical y labranza convencional.....	28
Cuadro 6: Rendimientos de los cultivos en las cosechas de 2011, 2012 y 2013	29
Cuadro 7: Valores del estadístico R de los contrastes entre siembra directa, labranza vertical y labranza convencional realizados con el Análisis de Similitudes (ANOSIM) usando distancias de Bray-Curtis partir de los perfiles de bandas de 16S rARN bacteriano.....	32
Cuadro 8: Índices de biodiversidad genética bacteriana calculados a partir de los datos de DGGE del 16S rARN en suelos con siembra directa, labranza vertical y labranza convencional	33
Cuadro 9: Logaritmo decimal del número de copias de 16S rARN en suelos con siembra directa, labranza vertical y labranza convencional	35
Cuadro 10: Correlación entre las variables originales con los ejes CP1 y CP2 derivados del análisis de componentes principales a partir del consumo diferencial de sustratos carbonados.....	37
Cuadro 11: Índices de biodiversidad calculados a partir del consumo diferencial de sustratos carbonados por las comunidades microbianas de lotes con siembra directa, labranza vertical y labranza convencional	39
Cuadro 12: Promedios de desarrollo del color (PDC) calculados a partir de consumo diferencial de sustratos carbonados por suelos con siembra directa, labranza vertical y labranza convencional.....	42
Cuadro 13: Número de copias de los genes <i>nirK</i> y <i>nirS</i> normalizado por el número de copias del 16S rARN bacteriano y la relación <i>nirS/nirK</i> en suelos con siembra directa, labranza vertical y labranza convencional	46
Cuadro 14: Modelos lineales de predicción para el número de copias de genes funcionales <i>nirK</i> y <i>nirS</i>	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Evolución de la superficie sembrada y de rendimientos de maíz y soja en la localidad de General Villegas, Provincia de Buenos Aires	9
Figura 2: Detalle de los tratamientos de labranza del experimento de larga duración de EEA INTA General Villegas	15
Figura 3: Precipitaciones en General Villegas en 2010, 2011, 2012 y 2013	30
Figura 4: Representación gráfica del análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) empleando distancias de Bray-Curtis a partir de los perfiles genéticos bacterianos de DGGE (16S rARN)	31
Figura 5: Evolución de los índices de biodiversidad genética bacteriana (DGGE de 16S rARN) a lo largo de las tres etapas de la secuencia agronómica	34
Figura 6: Logaritmo decimal del número de copias de 16S rARN por gramo de suelo a lo largo de las tres etapas de la secuencia agronómica.....	36
Figura 7: Representaciones gráficas de los análisis de componentes principales (ACP) del consumo diferencial de sustratos carbonados por las comunidades.....	38
Figura 8: Representaciones gráficas de los análisis de componentes principales (ACP) a partir del consumo diferencial de sustratos carbonados por las comunidades microbianas para las tres etapas de la secuencia agronómica en conjunto.....	39
Figura 9: Evolución de los índices de biodiversidad metabólica calculados a partir del consumo diferencial de sustratos carbonados en las tres etapas de la secuencia agronómica	41
Figura 10: Evolución del PDC a partir de consumo diferencial de sustratos carbonados por las comunidades microbianas del suelo en las tres etapas de la secuencia agronómica.....	43
Figura 11: Actividad de hidrólisis enzimática de las comunidades microbianas estimada por hidrólisis de diacetato de fluoresceína en pre- y post-cosecha en suelos con siembra directa, labranza vertical y labranza convencional	44
Figura 12: Porcentaje de rastrojo de maíz y de soja degradado a los 140 días de incubación en post-cosecha en suelos con siembra directa y labranza convencional.....	45
Figura 13: Evolución del número de copias de los genes <i>nirK</i> y <i>nirS</i> normalizado por el número de copias del 16S rARN bacteriano y la relación <i>nirS/nirK</i> a lo largo de la secuencia agronómica.....	47

ABREVIATURAS

ACP	Análisis de componentes principales.
AIC	Criterio de información de Akaike (<i>Akaike information criterion</i>).
ANOSIM	Test de análisis de similitudes (<i>Analysis of similarities</i>).
C/N	Relación entre carbono y nitrógeno.
CLPP	Perfiles fisiológicos de consumo de sustratos carbonados (<i>Community level physiological profiles</i>).
DGGE	Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (<i>Denaturing gradient gel electrophoresis</i>).
HFDA	Hidrólisis del diacetato de fluoresceína (<i>Hydrolysis of fluorescein diacetate</i>).
LC	Labranza convencional.
LV	Labranza vertical.
MO	Materia orgánica.
ML	Máxima verosimilitud (<i>Maximum likelihood</i>).
N total	Nitrógeno total.
NMDS	Análisis de escalonamiento multidimensional no métrico.
PCD	Promedio de desarrollo del color.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>).
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>).
REML	Máxima verosimilitud restringida (<i>Restricted maximum likelihood</i>).
SD	Siembra directa.

Resumen

Los microorganismos del suelo son agentes principales para el ciclado de nutrientes y el mantenimiento de la salud del sistema suelo. La intervención agrícola puede alterar las propiedades del suelo a través de su impacto sobre los microbiomas edáficos. Actualmente existe una batería de metodologías microbiológicas que permiten monitorear la estructura y funcionalidad de las comunidades de microorganismos del suelo. El objetivo general de este trabajo fue estudiar los cambios en las comunidades microbianas en suelos de un experimento de larga duración en la EEA Gral. Villegas del INTA (Pcia. de Buenos Aires, Argentina) con lotes manejados por labranza convencional (LC), labranza vertical (LV) o siembra directa (SD), con o sin fertilización en rotación continua maíz/soja. Detectamos efectos diferenciales de la SD y LC sobre diversos parámetros microbianos: cambios en la composición genética y funcional de la comunidad de eubacterias, modificaciones en la funcionalidad global y en la composición relativa de desnitrificadores basado en el recuento del número de copias de los dos genes conocidos que codifican para la nitrito reductasa: *nirS* y *nirK*. Funcionalmente las comunidades en SD fueron más activas que en LC. Estas diferencias no determinaron cambios a nivel de los perfiles fisiológicos de consumo de sustratos. Por otro lado, no observamos efectos de la fertilización sobre los parámetros microbianos, aunque ésta sí tuvo efecto sobre los rendimientos de los cultivos. En resumen, la combinación de metodologías experimentales, sumados al diseño del experimento de larga duración y al plan de muestreo permitieron incrementar el entendimiento acerca del efecto de los manejos tanto en la estructura como en la funcionalidad de las comunidades microbianas del suelo.

Palabras clave: Ecología microbiana, Siembra directa, Abundancia de eubacterias, Genes funcionales de desnitrificación.

Abstract

Soil microorganisms are major agents in the cycling of nutrients and health maintenance of soil systems. Agricultural interventions can alter soil properties through their impact on the soil microbiomes. Nowadays there is a toolbox of microbial methodologies that allow the monitoring of the structure and functionality of communities of soil microorganisms. The general goal of this thesis was to study the changes in the microbiomes in soils of a long-term duration experiment located at the INTA's General Villegas Experimental Station. (Buenos Aires Province, Argentina) with plots under conventional tillage (CT), vertical tillage (VT) and no-tilling (NT) practices, with and without fertilization in a continuous corn/soybean rotation. We detected differential changes between CT and NT over several microbial parameters: changes in the genetic and functional composition of eubacterial communities, modifications in the global functionality and changes in the relative composition of denitrifiers based on the count of gene copies for the two genes known to code for the nitrite reductase enzyme: *nirK* and *nirS*. The NT communities were functionally more active. These differences did not determine changes in the substrate consumption physiological profiles. Additionally, we did not find any effect of fertilization on the microbiological parameters, although it did affect the yields of the crops. In summary, the combination of experimental methodologies, the design of the long-term experiment and the sampling plan allowed us to understand the effect of agricultural practices on the structure and functionality of soil microbial communities.

Keywords: Microbial ecology, No tillage system, Abundance of eubacteria, Denitrification functional genes.

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Descripción del problema y antecedentes

La población humana es altamente dependiente del suelo como principal proveedor de alimentos y es por ello que en los últimos años ha crecido el interés por la conservación de este recurso natural considerado no renovable a escala de tiempo humano. La intervención agrícola puede alterar la calidad del suelo modificando alguna o varias de sus características, sean éstas de carácter físico, químico o biológico. Los microorganismos del suelo son los principales agentes para la adquisición de nutrientes y el mantenimiento de salud del sistema a través del ciclado de nutrientes, la regulación de la dinámica de la materia orgánica, el secuestro de carbono, la emisión y mitigación de gases de efecto invernadero y la estructuración del suelo (Correa, 2013). Además de su rol protagónico en el funcionamiento del suelo, los microorganismos han demostrado una alta sensibilidad y una rápida respuesta a los disturbios, algo que no ocurre con los parámetros físico-químicos actualmente empleados para el monitoreo de suelos. Es por ello que el monitoreo de las comunidades microbianas puede constituir una herramienta muy valiosa para proveer señales tempranas de alteración del ambiente edáfico (Graham y Haynes, 2005; Bastida y col., 2008; Ritz y col., 2009). Asimismo, la información que brinda el estudio de las comunidades microbianas es amplia e integrada, debido a su íntima relación con el tipo del suelo, su temperatura, pH, contenido de humedad y tensión de oxígeno, entre otros factores.

El tipo de laboreo, su intensidad, la cobertura vegetal y la fertilización son prácticas de manejo agronómico que pueden alterar las características edáficas y, en consecuencia, a las comunidades microbianas del suelo. A su vez, los efectos de una práctica de manejo pueden no ser constantes a lo largo del año y depender de la etapa del ciclo productivo. Los suelos son muy heterogéneos, tanto espacial como temporalmente, y esta variación debe tenerse en cuenta en los diseños experimentales que intentan determinar los efectos las prácticas de manejo sobre las comunidades microbianas. Por ejemplo, Bissett y col. (2013) encontraron una variación significativa en la estructura y función de las comunidades microbianas a lo largo del ciclo productivo del trigo. En contraste, otros autores, en suelos bajo producción de algodón, observaron un impacto del laboreo solo en invierno y en etapas más tempranas del desarrollo del cultivo cuando la influencia de las raíces era mínima (Feng y col., 2003).

El laboreo puede afectar a los suelos modificando varias de sus propiedades físicas y químicas y sus consecuencias también se detectan sobre las comunidades microbianas que lo habitan (Lupwayi y col., 1998; Jackson, 2003; Graham y Haynes, 2005; Cavagnaro y col., 2008; Cookson y col., 2008; Yin y col., 2010; Hayden y col., 2010; Kong y col., 2010; Vargas-Gil y col., 2011; Perez-Brandán y col., 2012; Bissett y col., 2013). Por ejemplo, la oxigenación que resulta de la remoción del suelo puede promover la dominancia de microorganismos aeróbicos y la consecuente aceleración de la mineralización, resultando a largo plazo en una disminución de la reserva nutricional del suelo. La incorporación de residuos vegetales por laboreo con reja y vertedera promueve su rápida degradación y deja al suelo sin cobertura, lo cual incide sobre los regímenes térmico e hídrico del ambiente edáfico y consecuentemente sobre las comunidades microbianas. En cambio, la siembra directa es un manejo más conservacionista que permite una mayor retención de materia orgánica y una mejor estructuración, dos características ampliamente estudiadas desde la implementación de la siembra directa (Galantini y col., 2007; Álvarez y Steinbach, 2009; Amiotti y col., 2012; Schmidt y Amiotti., 2015). La mejora de estas características en suelos conlleva a

un ambiente sustancialmente más favorable para la microbiota, sin embargo, las mejoras mencionadas no siempre se dan (Álvarez y Steinbach, 2009; Schmidt y Amiotti, 2015). Numerosos trabajos estudian la estrecha relación con las comunidades microbianas del suelo con la mejora en los contenidos de carbono (Kuramae y col., 2011, Bünemann y col., 2011; Ng y col., 2012; Navarro-Noya y col., 2013 Carbonetto y col., 2014). Por ejemplo, Mathew y colaboradores (2012) observaron una biomasa microbiana mayor y más activa en lotes bajo siembra directa que en suelos con laboreo bajo cultivos de trigo y maíz. Otros autores encontraron mayor abundancia de hongos y bacterias cultivables en suelos con siembra directa que en suelos con labranza convencional, además de una mayor actividad microbiana (Perez-Brandán y col., 2012). Asimismo, Vian y colaboradores (2009) informaron que las diferencias en la distribución y la actividad de los microorganismos en el perfil del suelo dependen de la distribución de los residuos vegetales en profundidad, lo cual depende del tipo de labranza. No obstante, la respuesta de comunidades microbianas no siempre es observada, así como no siempre es consistente. Esta inconsistencia se debe a la complejidad de la respuesta y los numerosos factores involucrados en ella. Pero es indiscutible que el rol importante de los microorganismos del suelo, tanto en la formación como en el mantenimiento de las funciones del suelo debe ser comprendido de la mejor manera posible y en base a la información proceder a implementar manejos que permitan una mejor conservación y un mejor desempeño de estos importantes actores del suelo para cada zona y situación en particular. Especialmente en Argentina que es un país con amplia explotación agrícola y con escasos niveles de monitoreo de la biomasa y procesos microbianos edáficos.

El cultivo también puede influir sobre las comunidades microbianas edáficas a través de la calidad y cantidad de sus exudados radicales y los residuos de cosecha remanentes (Hayden y col., 2010; Ng y col., 2012; Schneider y col., 2012; McDaniel y col., 2014). Yin y colaboradores (2010) encontraron que la composición de la comunidad bacteriana difería entre los lotes con cultivo continuo de trigo y aquellos con rotación trigo/soja. Por otro lado, Vargas Gil y colaboradores (2011) observaron que tanto la estructura bacteriana como la fúngica de suelos con soja continua difirieron de la de los suelos con rotación soja-maíz en ambos casos con manejo de siembra directa. En este sentido, la relación C/N en los residuos vegetales puede ser la responsable en promover modificaciones en las comunidades microbianas, a través del contenido de nutrientes en la materia orgánica aportada al suelo (Brajesh y col., 2011). Por ejemplo, Hayden y colaboradores (2010) observaron un incremento en la fijación biológica de nitrógeno potencial asociado al aumento en la relación C/N y a la calidad de los sustratos carbonados en los residuos de cosecha y/o exudados radicales. Asimismo, los efectos de rotaciones no siempre son evidentes. Mientras Schneider y colaboradores (2012) evidenciaron que los microorganismos son afectados por la calidad de los residuos vegetales, otros autores no encontraron relación de las comunidades microbianas con la rotación de cultivos (Navarro-Noya y col., 2013) o ante incorporación de diferentes residuos (Henderson y col., 2010) y esto puede deberse a la adaptación de estas comunidades de ambientes agrícolas a las constantes intervenciones (Carbonetto y col., 2014).

La fertilización también puede modificar la estructura y función de las comunidades microbianas a través de la variación del estado nutricional del suelo (Coelho y col., 2009; Hallin y col., 2009; Chen y col., 2010; Fierer y col., 2012). Los efectos de la fertilización pueden ser positivos o negativos y dependientes del tipo de nutriente, la formulación empleada, la dosis, así como del momento de aplicación.

Además, existen otros aspectos a tener en cuenta tales como la movilidad, la reacción residual en el suelo y la frecuencia de aplicación del fertilizante. Varios trabajos reportaron efectos de fósforo sobre las comunidades microbianas del suelo (Hayden y col., 2010; Bodelier, 2011; Bünemann y col., 2011; Carbonetto y col., 2014; Massey y col., 2016), nutriente cuya aplicación adquiere importancia en la Argentina debido a los primeros síntomas de su deficiencia en ambientes bajo cultivo. Sin embargo, sus efectos sobre las comunidades microbianas permanecen poco consistentes, principalmente por la escasez de la información para comprender respuestas tan complejas como las que ofrecen los microorganismos del suelo. Según lo que podemos encontrar en la bibliografía las comunidades microbianas responden a la aplicación de fósforo de manera positiva (Hayden y col., 2010; Liu y col., 2012; Ng y col., 2012), negativa (Parfitt y col. 2010) o sin modificación (Massey y col., 2016). Más claros son los efectos en la microbiota edáfica de la fertilización nitrogenada (Kowalchuk y Stephen, 2001; Suwanwaree y Robertson, 2005; Cavagnaro y col., 2008; Hayden y col., 2010; Fierer y col., 2012). Por ejemplo, Fierer y col. (2012) detectaron por pirosecuenciación cambios significativos en la composición y capacidad catabólica de las comunidades bacterianas de suelos con distintos niveles de fertilización nitrogenada, y observaron una comunidad microbiana más activa en los lotes con mayores niveles de nitrógeno. Asimismo, distintos autores observaron que el contenido de fósforo del suelo (Hayden y col., 2010) y la fertilización nitrogenada (Kowalchuk y Stephen, 2001) afectan significativamente las poblaciones de bacterias nitrificadoras. El efecto de la fertilización, además, puede ser potenciado por el laboreo del suelo (Hayden y col., 2010).

El ciclo biogeoquímico del nitrógeno se destaca por su gran importancia agronómica y ambiental. La participación de los microorganismos en este ciclo es crucial ya que éstos están involucrados en la fijación biológica de nitrógeno y en los procesos de nitrificación y desnitrificación. En estos procesos intervienen varias enzimas funcionales clave: la nitrogenasa, la amonio-monooxigenasa y la nitrito reductasa, codificadas por los genes *nifH*, *amoA* y *nirK/nirS* respectivamente. La medición directa en el suelo de los niveles de estas enzimas o sus actividades resulta complicada, pero como una aproximación se ha utilizado con éxito la cuantificación de los genes que las codifican, resultando ser un buen indicador de la actividad potencial de los respectivos procesos biológicos en las comunidades microbianas del suelo (Kowalchuk y Stephen, 2001; Cavagnaro y col., 2008; Chen y col., 2010; Hayden y col., 2010; Morales y col., 2010).

La desnitrificación es un proceso clave, regido por los microorganismos del suelo, a través del cual se pierde el nitrógeno disponible para las plantas. Este proceso es estrictamente anaeróbico, sin embargo, la presencia de micrositios anóxicos permite que la desnitrificación tenga lugar incluso en suelos bien aireados. El proceso completo consiste en varios pasos sucesivos: reducción de nitrato, reducción de nitrito, reducción de óxido nítrico y, finalmente, reducción de óxido nitroso. El segundo paso de este proceso es un paso fundamental ya que en él ocurre la reducción de nitrito soluble en óxido nítrico que es un gas (Zumpf, 1997). Además, la enzima nitrito reductasa que cataliza este paso es un claro ejemplo de redundancia funcional de los microorganismos (Jones y Hallin, 2010), ya que siendo funcionalmente equivalentes difieren en su estructura. Existen dos tipos de estas enzimas que son codificadas por genes diferentes, cada uno es exclusivo de determinados grupos bacterianos (Jones y col., 2008): *nirS* (enzima utiliza citocromo *cd1* como cofactor) y *nirK* (utiliza cobre como cofactor). Esta característica no solo permite estudiar el potencial de desnitrificación (Philippot y col., 2009; Cuhel y col., 2010; Graham y col., 2010; Morales y col., 2010) de estos suelos,

sino que también posibilita su utilización como marcadores de la calidad de los ambientes (Hallin y col., 2009; Jones y Hallin, 2010). Esto es debido a una diferenciación en los nichos para ambos grupos de desnitrificadores, definidos por el tipo de enzima que codifican (Nir) (Oakley y col., 2007; Smith y Ogram, 2008; Jones y Hallin, 2010; Keil y col., 2011). Es posible encontrar estas enzimas en un amplio rango de ambientes terrestres, sin embargo, los microorganismos del tipo NirK parecen tener una mayor selectividad de hábitat (Jones y Hallin, 2010), pero los microorganismos del tipo NirS forman la mayor parte de los desnitrificadores cultivables (Zumft, 1997). La proporción de ambos tipos en la población de microorganismos Nir no parece ser constante, ya que algunos autores informan la mayor abundancia numérica de genes *nirK* (Yoshida y col., 2009; Jones y Hallin, 2010; Bannert y col., 2011; Rosa y col., 2014) y otros de los genes *nirS* (Bothe y col., 2000; Kandeler y col., 2006; Geets y col., 2007). De los factores que modulan la estructura de comunidades desnitrificadoras el contenido de carbono parece ser el factor más importante (Kong y col., 2010), sin embargo, esta población también puede ser afectada por la aplicación de nitrógeno (Suwanwaree y Robertson, 2005) o la humedad del suelo (Jones y Halli, 2010). En suelos argentinos, el estudio de este grupo funcional ha recibido poca atención es bajo, siendo extremadamente escasa la información publicada sobre el comportamiento de los microorganismos del tipo NirK y NirS frente a diferentes estrategias de manejo agrícola (Rosa y col., 2014).

El estudio de las comunidades microbianas en un sistema tan complejo como el suelo requiere el empleo de varias metodologías que provean información complementaria y permitan un análisis integral (Correa y col., 2013). Las técnicas modernas de biología molecular y de ecología microbiana permiten analizar la estructura de las comunidades microbianas, así como sus respuestas funcionales. Algunas de ellas permiten incluir en los análisis a los microorganismos no cultivables, que son el grupo mayoritario de los que habitan el suelo.

Dos técnicas actualmente muy utilizadas son la electroforesis en geles de poliacrilamida con gradiente desnaturizante o DGGE (*Denaturing gradient gel electrophoresis*) y la PCR cuantitativa (qPCR). La técnica de DGGE (Muyzer y col., 1993) es un método de *fingerprinting* basado en la separación de fragmentos de un gen de interés amplificados por PCR a partir de ADN extraído del suelo, en geles con gradiente químico desnaturizante. Puede emplearse tanto para genes estructurales como funcionales. Como ejemplo, de estudios estructurales los marcadores taxonómicos por excelencia son los genes que codifican las subunidades de ARN ribosomal: 16S en estudios de bacterias y 18S en estudios de hongos. El análisis del perfil de bandas que se obtiene permite evaluar la diversidad presente en comunidades de diferentes ambientes o suelos bajo distintos tratamientos, permitiendo realizar estudios comparativos de la estructura de las comunidades bacterianas. La metodología de PCR cuantitativa es una herramienta altamente sensible que, a diferencia de PCR tradicional de punto final, permite seguir la curva de amplificación del gen de interés y establecer relaciones cuantitativas entre muestras. De esta manera se estima con bastante confianza la cantidad inicial de ADN blanco en la muestra original. Mediante este método puede examinarse la estructura de las comunidades microbianas en los distintos suelos y cuantificarse el número de grupos funcionales utilizando como blanco regiones conservadas de genes con roles clave en ciclos biogeoquímicos importantes (Smith y Osborn, 2008). También puede determinarse la abundancia relativa de bacterias, hongos y arqueas, utilizando como blanco los genes ribosomales 16S o 18S. (Suzuki y col., 2000; Smith y Osborn, 2008).

Además de los métodos moleculares, existen otros que permiten estudiar a las comunidades microbianas edáficas desde un enfoque fisiológico. Una de ellas, la técnica CLPP (*Community level physiological profiling*) (Garland y Mills, 1991) es una metodología rápida y sencilla usada para caracterizar la funcionalidad de la microbiota mediante la evaluación del número, tipo y tasa de utilización de diferentes fuentes carbonadas. Se siembran pequeños volúmenes de suspensiones de suelo en microplacas con varias fuentes carbonadas, otros nutrientes esenciales y un colorante que facilita el monitoreo del consumo diferencial de los sustratos. Se incuban a una temperatura apropiada y a diferentes tiempos se mide la absorbancia. También existen metodologías que permiten realizar estimaciones de actividades microbianas más generales. Una de ellas es la de hidrólisis de diacetato de fluoresceína (HFDA) (Green y col., 2006) que estudia la actividad de numerosas enzimas extra- e intra-celulares (lipasas, proteasas, esterasas, etc.) en una reacción no específica, por lo que es considerada un buen indicador de actividad microbiana global.

A la hora de abordar un estudio de comunidades microbianas, se deben tener en cuenta tanto la estructura como la funcionalidad de las mismas (Nannipieri y col., 2003; Zak y col., 2003) ya que los cambios en la composición podrían tener una relación estrecha con cambios en su funcionalidad (Fierer y col., 2012). Existen estudios que sugieren que ante un cambio en la composición de las comunidades microbianas, éstas pueden mantener intactas sus funciones sin perjudicar los procesos microbiológicos del suelo (Strickland y col., 2009; Fukami, 2010). Dicho fenómeno se llama redundancia funcional y se da cuando la riqueza y diversidad de especies en una comunidad es suficiente para suplantar las pérdidas, manteniendo el correcto funcionamiento del sistema, o bien, cuando se pierden microorganismos numéricamente y funcionalmente menos importantes (Wertz y col., 2007). El grado de redundancia funcional es dependiente de la comunidad en cuestión, es decir, la capacidad de mantener funciones ante un cambio en la composición no es la misma en todas las comunidades (Strickland y col., 2009; Fukami, 2010). Un ejemplo por excelencia de la redundancia funcional es el grupo de los desnitrificadores. Este grupo de microorganismos es muy diverso genéticamente, su funcionalidad raramente resulta afectada ante una disminución en la riqueza. Un aspecto a tener en cuenta frente a la mantención de los procesos debida a la redundancia funcional microbiana es el rendimiento en la realización de dichos procesos. Por ejemplo, Philippot y colaboradores (2013) demuestran que la pérdida de diversidad microbiana de desnitrificadores puede alterar procesos a nivel del ecosistema, sugiriendo que la importancia de la redundancia funcional, al menos para este grupo microbiano, ha sido exagerada. Asimismo, Fierer y colaboradores (2012) también sugieren que las modificaciones en la estructura microbiana afectan las tasas de los procesos a nivel del ecosistema. Por ejemplo, las bacterias oxidadoras de amonio a pesar de presentar poblaciones más numerosas en suelos con manejo más intensivo, tienen menores rendimientos y tasas de oxidación en comparación con aquellas de suelos con menores intensidades de laboreo y niveles de fertilización (Okano y col., 2004). Estos son solo algunos ejemplos de la importancia de vincular los análisis de estructura con los que estudian la funcionalidad de las comunidades microbianas.

En la literatura existen varios trabajos que reportan que el manejo de los suelos induce cambios estructurales y funcionales en las comunidades microbianas que los habitan. La mayoría de ellos se enfoca en comparaciones de suelos bajo agricultura con los de ambientes naturales (Bothe y col., 2000; Gomez y col., 2004; Patra y col., 2006; Hayden y col., 2010; Montecchia y col., 2011; Montecchia y col., 2015; Tosi y col., 2016) o forestales (Rösch y col., 2002; Suwanwaree y Robertson, 2005; Brajesh y col.,

2011) o bajo sistemas de producción orgánica (Vian y col., 2009; Kong y col., 2010; Romaniuk y col., 2011; Vega-Avila y col., 2015). Asimismo, existen numerosos trabajos en relación al efecto de la fertilización nitrogenada (Kowalchuk y Stephen, 2001; Cavangaro y col., 2008; Coelho y col., 2009; Hallin y col., 2009; Chen y col., 2010; Hayden y col., 2010; Fierer y col., 2012; Carbonetto y col., 2014; Rosa y col., 2014) sobre la microbiota del suelo. Si bien, existen antecedentes de estudio de diferentes aspectos de comunidades microbianas en suelos agrícolas de la Argentina la mayoría de ellos se realizan en suelos de establecimientos productivos (Rascovan y col., 2013; Carbonetto y col., 2014; Rosa y col., 2014; Figuerola y col., 2015) en los cuales es difícil contar con condiciones de manejo constantes a lo largo del tiempo y la historia conocida en exactitud, ventaja que otorgan los experimentos de larga duración. En efecto, también existen trabajos en contextos de experimentos controlados de distinta duración empleando metodologías de estudio tradicionales (Abril y col., 1995; Diosma y Balatti, 1998) o modernas (Fernández-Canigia MV, Díaz-Zorita M (1999; Meriles y col., 2009; Vargas Gil y col., 2011; Perez-Brandán y col., 2012) y aun así la información con la que contamos sigue siendo escasa. Es por ello que la posibilidad de realizar estudios en uno de estos experimentos que compara, además de los diferentes tipos de labranza con o sin fertilización en una rotación continua de cultivos puede ser una oportunidad que permita comprender mejor los efectos de la agricultura sobre la microbiota de suelo estabilizada frente a la uniformidad de condiciones año tras año. Esta relativa uniformidad de condiciones permite un mejor establecimiento de las relaciones causa-efecto con la menor incertidumbre posible. Otra manera de disminuir dicha incertidumbre es relevando un elevado número de sitios diferentes. Sin embargo, muchas veces esto último no es factible por razones operativas y por sus altos costos. Trabajar con muestras de suelo extraídas de un sitio experimental de larga duración, donde las condiciones de manejo se mantienen idénticas y controladas desde 1991 nos permitirá determinar con mayor precisión el impacto de las variables de manejo analizadas sobre las comunidades microbianas. Asimismo, nos asegura una permanencia de estas condiciones en el futuro para las evaluaciones posteriores, sea para responder nuevas preguntas o aquellas que quedarían sin resolver. Por otra parte, ya sea que se trate de estudios realizados en suelos de campos productivos o experimentales, la literatura reporta que el origen geográfico modula las características de las comunidades de los suelos. Comparados con la información existente a nivel global, es poco lo que se conoce sobre la diversidad microbiana en el noroeste pampeano semiárido, un ambiente de relativa fragilidad para la agricultura, su relación con los procesos que se verifican en el suelo y su productividad. Muchos de los estudios biológicos ya realizados en suelos de la región pampeana se han focalizado en variables que se podrían considerar “macro”, como es la respiración, las tasas de nitrificación, desnitrificación, etc. Las técnicas más modernas de biología molecular y de ecología microbiana permiten un acercamiento sin precedente sobre las estructuras genéticas de las comunidades y sus cambios, así como el análisis detallado de respuestas funcionales. Nuestra atención será focalizada en los cambios causados en la estructura y funcionalidad de las comunidades bacterianas por los manejos agronómicos (labranzas, cultivos, fertilización) y su repercusión en el funcionamiento del suelo. Creemos que estos cambios son detectables por las metodologías propuestas, y que éstos se evidencian mucho antes que los detectables por las variables físico-químicas. Desde un punto de vista más básico, la investigación permitirá un conocimiento más acabado de la relación entre variables ambientales y respuesta de las comunidades microbianas. Por otra parte, y desde una perspectiva más aplicada, se realizará un aporte que servirá como

conocimiento de base para investigaciones futuras de mayor profundidad y de procesos más puntuales.

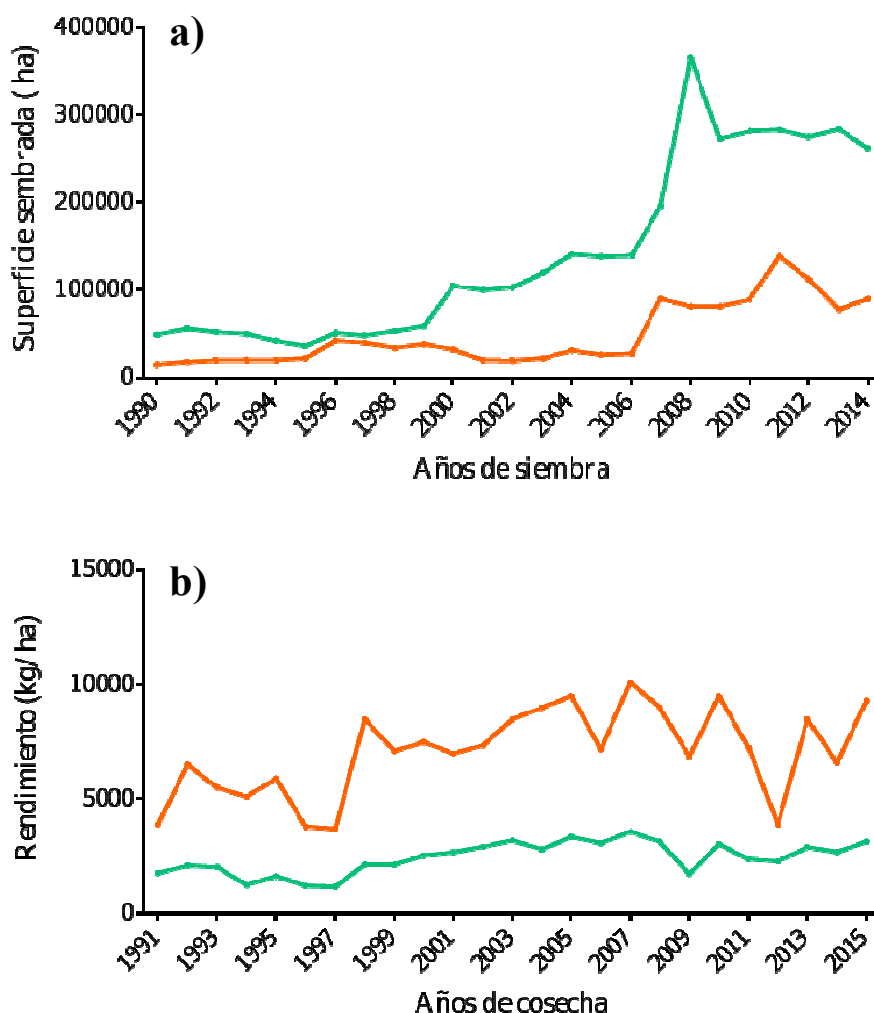


Figura 1: Evolución de la superficie sembrada (a) y de rendimientos (b) de maíz (naranja) y soja (verde) en la localidad de General Villegas, Provincia de Buenos Aires (Fuente; Estimaciones MAGyP, 2015).

El oeste de la Región Pampeana, es una zona con gran superficie bajo la producción de cultivos extensivos de secano. Geográficamente constituye una planicie sub-húmeda con clima templado moderadamente continental. Las precipitaciones son primavero-otoñales con niveles normales de 913 mm (promedio de 30 años) y altamente variables entre años. Dentro de esta zona en el partido de General Villegas los suelos predominantes son profundos, arenosos a franco-arenosos: Hapludoles típicos y Hapludoles énticos, con capacidades de uso agrícola II y III. Son suelos de estructura débil, bien drenados, con baja capacidad de almacenaje de agua, niveles de materia orgánica desde bajos a moderados y con limitada fertilidad natural (Zaniboni y Landa, 2012). La principal actividad agrícola en la zona es la producción de cultivo extensivo, habiendo según las evaluaciones de AAPRESID en la campaña de 2013/24 alrededor de 67% de la superficie bajo el uso agrícola y 20% con uso ganadero. Desde el punto de

vista de la superficie sembrada, el cultivo de verano predominante es la soja, seguido por el maíz y ambos cultivos experimentaron un importante incremento en las últimas dos décadas sin una modificación sustancial en rendimientos por hectárea (Figura 1). La productividad de los cultivos en esta región está estrechamente relacionada con el contenido de materia orgánica en el suelo, el cual tiene un efecto positivo sobre los rendimientos (Díaz-Zorita y col., 2000).

Varios trabajos reportaron incrementos de la superficie bajo cultivo en los últimos años en detrimento de la actividad ganadera de la zona, así como una mayor predominancia del cultivo de soja en las rotaciones (Landa, 2008; Zaniboni y Landa, 2012). La continua actividad agrícola y la dominancia de un único cultivo pueden poner en peligro la salud de estos suelos, dada su frágil estructura y la baja fertilidad. De allí la importancia de las herramientas que permitan monitorear y alertar sobre los posibles cambios en el estado de estos suelos y en las comunidades microbianas que los habitan.

1.2. Objetivos, hipótesis y predicciones

El objetivo general de este trabajo fue evaluar el impacto de diferentes manejos agronómicos sobre las comunidades microbianas edáficas en un experimento de larga duración y determinar si los cambios se manifiestan a nivel de su estructura, funcionalidad o ambos.

Los objetivos específicos:

- Estudiar los efectos del tipo de laboreo, del tipo de cultivo y de la fertilización con fosfato mono-amónico sobre:
 - la estructura genética de las comunidades bacterianas y su abundancia;
 - el perfil catabólico de las comunidades microbianas y la actividad microbiana global y su actividad;
 - la abundancia de bacterias desnitrificadoras y la estructura de este grupo funcional.
- Establecer la relaciones existentes entre los parámetros físico-químicos y las variables microbiológicas estudiadas para una evaluación integral del efecto de las prácticas de manejo sobre la calidad de estos suelos.

Las hipótesis del trabajo:

- El tipo de laboreo (diferentes niveles de disturbio) y la fertilización con fosfato mono-amónico inducen cambios en la estructura genética de las comunidades bacterianas.
- El tipo de laboreo y la fertilización con fosfato mono-amónico modifican los perfiles catabólicos de las comunidades microbianas.

- El tipo de laboreo y la fertilización con fosfato mono-amónico alteran la abundancia y composición del grupo funcional de bacterias desnitrificadoras.
- La magnitud de las diferencias anteriores dependerá del cultivo y del momento del ciclo productivo.

Las predicciones del trabajo:

- El tipo de laboreo y la fertilización con fosfato mono-amónico inducen cambios en la estructura genética de las comunidades bacterianas, la abundancia de bacterias será mayor en suelos con siembra directa y fertilizados;
- El tipo de laboreo y la fertilización con fosfato mono-amónico modifican los perfiles catabólicos de las comunidades microbianas y promueven una mayor actividad en suelos con siembra directa y fertilizados;
- El tipo de laboreo y la fertilización con fosfato mono-amónico alteran la abundancia y composición del grupo funcional de bacterias desnitrificadoras, la abundancia será mayor en suelos con siembra directa y fertilizados.
- La magnitud de las diferencias anteriores dependerá del cultivo y del momento del ciclo productivo.

Capítulo 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Diseño del experimento y toma de muestras

El experimento se ubica en la EEA INTA General Villegas (Drabble, Provincia de Buenos Aires) y fue iniciado en 1991 sobre una pastura de festuca con cinco años de duración. Los suelos del campo experimental son Hapludoles típicos de serie La Belita con capacidad de uso agrícola II. Son profundos, franco-arenosos, de buen drenaje pero pobres en estructura y con bajos niveles de materia orgánica.

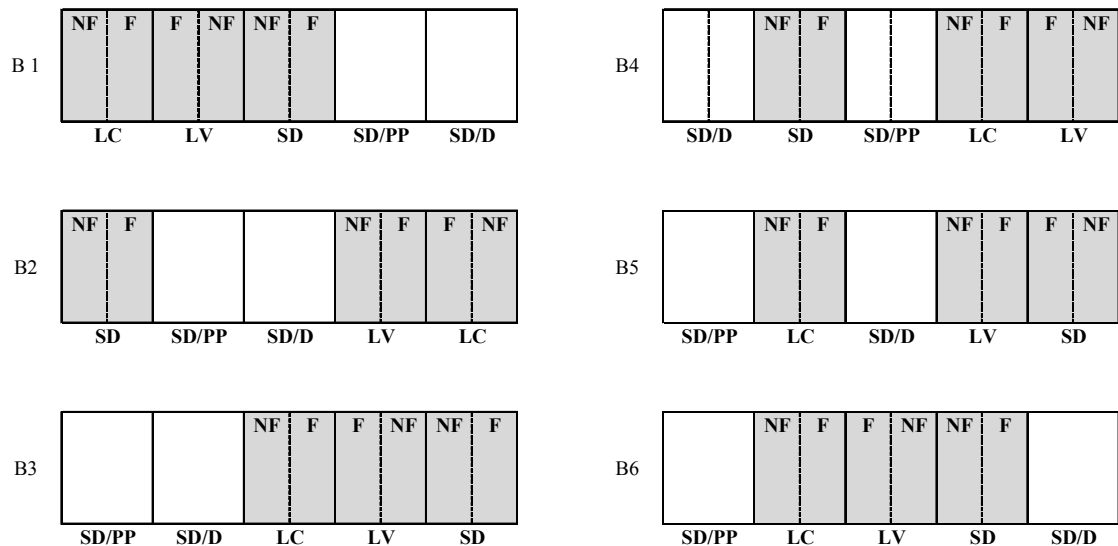


Figura 2: Detalle de los tratamientos de labranza del experimento de larga duración de EEA INTA General Villegas. Los tratamientos pintados con gris son los evaluados en este trabajo. SD: siembra directa desde 1991, LV: labranza vertical desde 1991, LC: labranza convencional desde 1991, SD/D: siembra directa desde 2001 sobre suelo degradado, SD/PP: siembra directa desde 2001 sobre pastura de festuca de 15 años, NF: sin fertilización y F: con aplicación de fosfato mono-amónico.

El experimento fue diseñado en seis bloques donde cada año tres de ellos se siembran con maíz y otros tres con soja, rotando los cultivos al año siguiente. Los bloques no se siembran al azar sino que se asigna un cultivo a los primeros tres bloques y otro a los últimos tres. El maíz se siembra en la primera quincena de octubre y se fertiliza en V6 con urea a razón de 200 kg por hectárea. La soja se siembra en la segunda quincena de noviembre inoculando las semillas con rizobios compatibles. Los tratamientos de manejo dentro de cada bloque están completamente aleatorizados en lotes de 20 metros de ancho y 40 metros de largo. En total son cinco los tratamientos de labranza en este experimento: siembra directa (SD) desde 1991, labranza vertical (LV) desde 1991, labranza convencional (LC) desde 1991, SD desde 2001 sobre suelo degradado y, finalmente, SD desde 2001 sobre pastura de festuca de 15 años (Figura 2). De estos tratamientos seleccionamos tres para el presente trabajo: SD, LV y LC que se aplican desde el año 1991. A su vez cada uno de los tratamientos desde el año 2001 se divide en dos sub-parcelas (10x40 metros) para los tratamientos de aplicación de fosfato mono-amónico: fertilizado (F) y sin fertilizar (NF). El fertilizante se aplica a la siembra a razón de 50 kg por hectárea en el cultivo de soja y 75 kg en maíz. De esta manera, el diseño jerárquico de los factores del experimento resulta:

cultivo/bloque/labranza/fertilización. Además, se seleccionaron al azar dos sitios en cada sub-parcela para la toma de muestras que permitiría incorporar la variabilidad espacial de estos suelos. Estos sitios se mantuvieron en los años de muestreo.

Se realizaron muestreos en tres años sucesivos en diferentes etapas de la secuencia agronómica: en barbecho en agosto de 2011 (barbecho), en post-cosecha en mayo de 2012 (post-cosecha) y en pre-cosecha de ambos cultivos en mayo de 2013 (pre-cosecha). En la campaña de 2013 el ciclo del cultivo fue retrasado debido a la pérdida total de las plantas en las primeras etapas de desarrollo causada por una inundación en la zona. Ambos cultivos fueron sembrados a fines de diciembre. Debido al atraso en la fecha de siembra se decidió no efectuar un muestreo en post-emergencia del cultivo.

Las muestras de suelo fueron tomadas en los entre-surcos en dos sitios seleccionados al azar por lote de cada tratamiento, definido como combinación de modalidades de laboreo y fertilización. Cada muestra consistió en 20 piques de barreno (2,5 cm de diámetro) a una profundidad de 10 cm, removiendo previamente el rastrojo de la superficie. Las muestras se acondicionaron en cajas térmicas y fueron transportadas al laboratorio, donde fueron homogeneizadas y tamizadas a través de una malla de 2 mm y almacenadas a -80°C ó 4°C, según se destinaron a análisis moleculares o a estudios fisiológicos, respectivamente.

2.2. Análisis físico-químicos

La medición del pH se realizó en pasta (relación 1:2,5 suelo:agua) (Sparks y col., 1996). Las determinaciones de los contenidos de materia orgánica y de nitrógeno total fueron realizados en el laboratorio de manejo y conservación de suelos (Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires) mediante Walkley-Black (Walkley, 1947) y Kjeldahl (Bremner, 1960), respectivamente. Las fracciones de arena, limo y arcilla se determinaron por sedimentación (Robinson, 1922) por el laboratorio de calidad de alimentos, suelos y agua (EEA INTA Pergamino). Para la clasificación desde el punto de vista agronómico, se utilizaron estándares para los suelos de Argentina diseñados para suelos francos, franco-limosos y franco-arcillosos de la zona pampeana (Cosentino, 2015). Los resultados fueron analizados con modelos de efectos mixtos para diseños jerárquicos con paquete nlme v3.1-120 (Pinheiro y col., 2015) con *R software* v3.2.0 (R Development Core Team, 2014) (Ver detalles del análisis en la sección 2.9).

2.3. Rendimientos de los cultivos

Los rendimientos de los cultivos fueron proporcionados por los colaboradores del INTA de General Villegas. Los datos fueron analizados con modelos de efectos mixtos para diseños jerárquicos con paquete nlme v3.1-120 (Pinheiro y col., 2015) con *R software* v3.2.0 (R Development Core Team, 2014) (Ver detalles del análisis en la sección 2.9). Además nos proveyeron de datos de precipitaciones mensuales, correspondientes a los años de realización de los muestreos, tomados en la misma EEA del INTA.

2.4. Estructura genética de las comunidades bacterianas

2.4.1. Extracción de ADN del suelo y cuantificación

La extracción de ADN se realizó a partir de una cantidad equivalente a 0,25 g de suelo seco utilizando el kit *Power Soil DNA isolation kit* (Mo Bio Laboratories) siguiendo el protocolo provisto e incluyendo el paso de lisis alternativo (70°C, 10 min). El ADN extraído se cuantificó mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5% en buffer Tris-Borato-EDTA 1x (TBE 1x) y tinción con *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen), utilizando como estándar de ADN *Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker*, 3 (Thermo Scientific), y el programa *Gel Analyzer 2010a Software* (Istvan Lazar, Copyright 2010). Todas las preparaciones de ADN se almacenaron a -20°C.

2.4.2. Amplificación y análisis por DGGE de los genes 16S ARNr

A partir de ADN total de suelo, se amplificó por PCR la región V6-V8 del gen ribosomal 16S con los cebadores universales para bacterias F984GC (5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGCACGGGGGGAACGCGAAGAA CCTTAC-3') y R1378 (5'-CGGTGTG TACAAGGCCCGGGAACG-3') (Heuer y col., 1997). La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50 µl conteniendo 5 ng de ADN, 0,25 µM de cada cebador, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 5% DMSO, 2,5 U de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen) y el buffer (1x) provisto con la enzima. La amplificación se realizó en un termociclador (Bioer Gene Pro Thermal Cycler) con el siguiente programa: 5 min a 95°C, 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C, 2 min a 72°C, y 30 min a 72°C (Montecchia y col., 2011). Los productos de PCR se verificaron por electroforesis en gel de agarosa 1% en TBE 1x revelado con SYBR Safe. Los fragmentos amplificados se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida 6% (37:1 acrilamida:bisacrilamida) de 20 cm de largo con gradiente desnaturante de urea y formamida (45-65%) en buffer Tris-acetato-EDTA 1x, a 60°C y 1700 Vh (Correa y col., 2007; Montecchia y col., 2011). Los geles fueron revelados con SYBR Green I y fotografiados con el sistema de documentación InGenius LHR2 (Syngene, UK) bajo iluminación UV. Las imágenes digitales (ver ejemplos en la Figura A2.1 en el Apéndice 2) de los geles fueron procesadas y analizadas con el programa GelComparII v 6.5 (Applied Maths, NV), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los perfiles de bandas de geles normalizados se obtuvieron con perfilamiento mínimo de 5,0% y posterior verificación manual. Los perfiles cuantitativos de bandas (presencia e intensidad) fueron representados gráficamente con análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS, de inglés: *nonmetric multidimensional scaling*) usando la medida de distancia de Bray-Curtis y el programa PAST 3.04 (Hammer y col., 2014). Además, se calcularon los valores de estrés como medida de bondad de ajuste de la relación lineal entre las distancias bidimensionales de NMDS con la matriz de distancias Bray-Curtis. En otras palabras, los valores de estrés indican la distorsión de la representación gráfica respecto a la matriz de distancias de Bray-Curtis. Por otro lado, las significancias de diferencias entre los tratamientos fueron testeadas mediante el análisis de permutación de similitudes ANOSIM (n=9999) con medida de distancia de Bray-Curtis empleando *Past software* v3.04 (Hammer y col., 2014). El análisis de permutaciones se realizó para cada bloque por separado, debido a que se corrió un gel

para cada bloque. Además, con los perfiles de bandas se calcularon índices de biodiversidad: riqueza (S , número de bandas), índice de diversidad (Ecuación 1) y equitatividad de Buzas y Gibson (Ecuación 2), donde n_i es el valor de la intensidad de la banda i . Los índices de biodiversidad fueron analizados con modelos de efectos mixtos para diseños jerárquicos con paquete nlme v3.1-120 (Pinheiro y col., 2015) con *R software* v3.2.0 (R Development Core Team, 2014) (Ver detalles del análisis en la sección 2.9).

$$\text{Diversidad de Simpson } (1 - D) = 1 - \sum \frac{n_i}{n} \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$\text{Equitatividad} = \frac{e^{-\sum \frac{n_i}{n} \ln \frac{n_i}{n}}}{S} \quad (\text{Ecuación 2})$$

2.4.3. Cuantificación del gen 16S ARNr por PCR cuantitativa (qPCR) en las muestras de suelo

La abundancia de bacterias totales se estimó utilizando el gen 16S ARNr como marcador, y los cebadores específicos EUB338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3') y EUB518R (5'-ATTACCGCGG CTGCTGG-3') (Fierer y col., 2005). El ensayo se llevó a cabo en un equipo *Mx3000P qPCR* (Agilent Technologies) empleando la mezcla *Fast Start Universal SYBR Green Master (ROX)* (Roche). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 15 µl conteniendo 7,5 µl, 10% DMSO, 0,3 µM de cada cebador y 2 ng de ADN de suelo. Las condiciones de la amplificación fueron: 10 min a 95 °C, 40 ciclos a 95 °C por 1 min, 53 °C por 30 s, 72 °C por 1 min, con la lectura de fluorescencia al final. La curva estándar se obtuvo a partir de diluciones seriadas de ADN genómico de *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110 (1.10^3 a 1.10^7 copias del gen 16S ARNr). Las muestras, curva estándar y negativos, se analizaron por triplicado en cada microplaca de PCR. La calidad del producto amplificado se verificó por medio del análisis de las curvas de disociación y en geles de agarosa 1% revelados con *SYBR Safe*. La eficiencia de las corridas estuvo entre 87% y 110%, mientras que el R^2 o bondad de ajuste estuvo en valores entre 0,985 y 0,999. Los controles negativos no presentaron amplificación en ninguna de las corridas. Para el análisis estadístico, los valores fueron transformados a logaritmo decimal del número de copias por gramo de suelo seco y analizados con modelos de efectos mixtos para diseños jerárquicos con paquete nlme v3.1-120 (Pinheiro y col., 2015) con *R software* v3.2.0 (R Development Core Team, 2014) (Ver detalles del análisis en la sección 2.9).

2.5. Perfiles fisiológicos de la comunidad microbiana del suelo

Para determinar los perfiles de utilización diferencial de sustratos carbonados se empleó el método colorimétrico (Semmartin y col., 2010) basado en el método desarrollado por Garland y Mills (1991). Para las muestras de post-cosecha y barbecho se emplearon microplacas estériles de 96 pocillos (Corning) preparadas en el laboratorio con 12 sustratos carbonados (L-asparagina, L-arginina, L-lisina, L-triptofano, ácido D-glutámico, ácido D-galacturónico, ácido valérico, Tween-80, sacarosa, D-manosa, D-glucosa y α -D-glucosa-1-fosfato) y para pre-cosecha 24 sustratos (L-asparagina, L-arginina, L-lisina, L-triptofano, L-prolina, L-fenilalanina, ácido D-glutámico, ácido D-galacturónico, ácido glutámico, ácido itacónico, ácido D-galacturónico, ácido P-cumárico, ácido caféico, D-glucosa, D-manosa, sacarosa, D-fructosa, D-xilosa, L-arabinosa, celobiosa, D-manitol, Tween-20, Tween-80 y putrescina). Para ello, a cada pocillo se le agregaron 50 μ l de la solución stock del sustrato correspondiente (3 g/L), 50 μ l de solución buffer (K_2HPO_4 21 g/L, KH_2PO_4 9 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 1,5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 300 mg/L, $CaCl_2$ 30 mg/L, $FeSO_4$ 15 mg/L, $MnSO_4$ 7,5 mg/L, $NaMoO_4$ 7,5 mg/L) y 50 μ l de solución de violeta de tetrazolio (7,5 mg/L) como indicador *redox* que desarrolla color cuando se produce CO_2 a partir de la respiración del sustrato carbonado. Todas las soluciones fueron previamente esterilizadas por filtración (<0,22 μ m, Millipore).

Para preparar las suspensiones de suelo, se agregó el equivalente a 2 g de suelo seco a un tubo conteniendo 10 ml de agua *Milli-Q* (Millipore) por duplicado para cada muestra. Las suspensiones de suelo fueron pre-incubadas durante 18 h a 28 °C con agitación para promover la utilización de cualquier fuente de carbono soluble presente en el suelo (Gomez y col., 2004). Luego de la incubación, las muestras se centrifugaron a 2800 g durante 5 minutos (Correa y col., 2007) para separar las células microbianas de las partículas del suelo. Los pocillos de las microplacas fueron inoculados con 50 μ l del sobrenadante diluido 1/10 y se midió la absorbancia a 590 nm correspondiente al tiempo inicial (t_0) con un lector de microplacas Multiscan EX (Thermo electron, France). Las microplacas se incubaron a 28 °C y se midió la absorbancia (A_{590}) cada 24 h durante 7 días. El desarrollo del color correspondiente a cada sustrato se normalizó restando el valor de absorbancia correspondiente al t_0 de cada muestra. Los datos fueron analizados por análisis multivariado de componentes principales (PCA) usando matriz de varianza-covarianza. Como medida de actividad para cada muestra se calculó el promedio de desarrollo de color (PDC) con datos normalizados. Los valores superiores a 0,2 fueron considerados como respuesta positiva para el cálculo de índices de biodiversidad: riqueza (S , número de sustratos oxidados), índice de diversidad de Simpson (Ecuación 1) y equitatividad de Buzas y Gibson (Ecuación 2), donde n_i es el valor de la A_{590} normalizada para el sustrato i . Los índices de biodiversidad fueron analizados con modelos de efectos mixtos para diseños jerárquicos con paquete nlme v3.1-120 (Pinheiro y col., 2015) con *R software* v3.2.0 (R Development Core Team, 2014) (Ver detalles del análisis en la sección 2.9). Para el análisis de la evolución de la riqueza a lo largo de la secuencia agronómica los valores correspondientes a pre-cosecha (donde se utilizaron 24 sustratos) fueron transformados a un máximo de 12 para que estos datos sean comparables con los demás muestreos.

2.6. Actividad microbiana del suelo

La actividad hidrolítica de las comunidades microbianas se evaluó para muestreos de pre-cosecha y post-cosecha por el método de hidrólisis de diacetato de fluoresceína (HFDA) optimizado por Green y col. (2006). A 1 g (equivalente en peso seco) de muestra se le agregaron 50 ml de buffer fosfato de sodio 60 mM (pH=7,6) y 0,5 ml de solución de diacetato de fluoresceína 4,9 mM como sustrato para la reacción enzimática. Las muestras fueron incubadas a 37 °C durante 3 h y luego se añadieron 2 ml de acetona para detener la reacción. Se transfirieron 30 ml de suspensión decantada a tubos de 50 ml, se centrifugaron a 8822 g durante 5 minutos, y el sobrenadante se filtró a través de papel Whatman n° 2 para remover las partículas de suelo. La curva estándar se confeccionó con 0,03, 0,1, 0,3 y 0,5 mg de fluoresceína sódica en 50 ml de buffer fosfato de sodio 60 mM (pH=7,6) y adición de 2,5 ml de acetona. El desarrollo de color en las muestras, los controles sin sustrato, los blancos sin suelo y la curva estándar, se midió por espectrofotometría a 490 nm en *Pharma Spec UV-1700* (Shimadzu). Se normalizaron las muestras restando el valor ($A=490$) de los blancos sin suelo de la correspondiente serie de muestras procesadas y los valores de los controles sin agregado de sustrato. Los datos fueron transformados a producción de fluoresceína (mg) por hora y fueron analizados con modelos de efectos mixtos para diseños jerárquicos con paquete nlme v3.1-120 (Pinheiro y col., 2015) con *R software* v3.2.0 (R Development Core Team, 2014) (Ver detalles del análisis en la sección 2.9).

La actividad saprofítica de las comunidades microbianas por descomposición de rastrojo *in vitro* se determinó únicamente para los tratamientos de SD y LC y para el muestreo de post-cosecha. Asimismo, se enterraron bolsitas de micro-tul con 2 g de rastrojo seco en bandejas con 200 g de suelo proveniente de cada tratamiento. En cada caso se utilizó el rastrojo proveniente del cultivo correspondiente. Las bandejas se incubaron durante 140 días a 25 °C en oscuridad y se mantuvo la humedad de 60% de capacidad de campo durante todo el ensayo. Luego de la incubación el rastrojo remanente se secó en estufa a 80 °C hasta peso constante. Los datos se analizaron con modelos de efectos mixtos para diseños jerárquicos con paquete nlme v3.1-120 (Pinheiro y col., 2015) con *R software* v3.2.0 (R Development Core Team, 2014) (Ver detalles del análisis en la sección 2.9).

2.7. Cuantificación de genes funcionales *nir* por qPCR

La abundancia de genes funcionales bacterianos involucrados en el proceso de desnitrificación (*nir*: nitrito reductasa) fue cuantificada para las tres etapas de la secuencia agronómica. Para el gen *nirK*, que codifica la enzima nitrito reductasa cuyo cofactor es cobre (*nirK*) se emplearon los cebadores nirK876/nirK1040 (Henry y col., 2004), y para el gen *nirS* que codifica para la enzima que usa como cofactor el citocromo cd1 los cebadores Cd3aF/R3cd (Throbäck y col., 2004). Las curvas estándar para cada ensayo se obtuvieron a partir de diluciones seriadas del producto de PCR de cada gen amplificado a partir de muestras de suelo. Las secuencias de los cebadores, las condiciones de reacción, los perfiles térmicos y los rangos de las curvas estándar empleados se detallan en el cuadro 1. La eficiencia de las corridas estuvo entre 91 y 95% para *nirK* y entre 91 y 99% para *nirS*. Las muestras, curva estándar y negativos, se analizaron por triplicado en cada microplaca de PCR. La calidad del producto

amplificado se verificó por medio del análisis de las curvas de disociación y en geles de agarosa 1% revelados con *SYBR Safe*. Los controles negativos no mostraron amplificación en ninguna de las corridas.

Para el análisis, los datos se normalizaron por el número de copias del gen 16S ARNr. Además se calculó la relación entre ambos genes *nirS/nirK*. Los datos fueron analizados con modelos de efectos mixtos para diseños jerárquicos con paquete nlme v3.1-120 (Pinheiro y col., 2015) con *R software* v3.2.0 (R Development Core Team, 2014) (Ver detalles del análisis en la sección 2.9).

Cuadro 1: Cebadores utilizados y los protocolos de qPCR para la cuantificación del número de copias de los genes *nirS* y *nirK*:

	<i>nirS</i>	<i>nirK</i>
Cebador <i>F</i> (5'-3')	Cd3aF (GTSACCGTSAAGGARACSGG)	nirK876 (ATYGGCGGVCAYGGCGA)
Cebador <i>R</i> (5'-3')	R3cd (GASTTCGGRTGSGTCTTGA)	nirK1040 (GCCTCGATCAGRTRTGGTT)
Volumen final de reacción	15 µl	
<i>Fast Start Universal SYBR Green Master (ROX)</i>	7,5 µl	
Concentración final de cebador por reacción	0,5 µM	0,6 µM
Cantidad de ADN por reacción	4 ng	2 ng
Programa	95 °C 10 min; 5 ciclos: 95 °C 15 s, 63 °C (-1 °C por ciclo), 72 °C 30 s; 41 ciclos: 95 °C 15 s, 58 °C 30 , 72 °C 30 s	
Curva estándar	2.101-2.105	
Referencia primer	Throbäck y col., 2004	Henry y col., 2004

2.8. Modelos de predicción para los genes funcionales *nir*

Se diseñaron modelos de predicción de los parámetros microbiológicos con las variables de fertilidad del suelo tales como el contenido de materia orgánica, relación entre carbono y nitrógeno, fósforo extractable, contenido de arcilla y contenido de limo. De los parámetros de estructura (número de copias del gen 16S ARNr) y funcionalidad (actividad enzimática global, número de copias de los genes *nirK* y *nirS* y la relación *nirS/nirK*) evaluados, los que mejor respuesta mostraron a estas variables fueron los números de copias de los genes *nirK* y *nirS*. Los modelos para estos genes se diseñaron para la etapa de post-cosecha, en la cual contábamos con la mayor cantidad de datos de las características del suelo, con la metodología de regresión lineal múltiple con paquete

RDS v0.7.7 (Handcock y col., 2016) con *R software* v3.2.0 (R Development Core Team, 2014).

2.9. Detalles de los análisis estadísticos con modelos de efectos mixtos

Para los análisis estadísticos de modelos lineales de efectos mixtos se empleó el paquete nlme v3.1-120 (Pinheiro y col., 2015) de R v3.2.0 (R Development Core Team, 2014). Los contrastes entre los tratamientos de SD y LV se realizaron con el paquete contrast v0.21 (Kuhn y col., 2016).

Como se indicó en la sección 2.1 el diseño del experimento tiene una jerarquía de factores anidados: cultivo/bloque/labranza/fertilización. Esto dificulta especialmente la visualización de las respuestas de los parámetros en función de los cultivos, y por esta razón los análisis estadísticos fueron realizados por separado para cada cultivo. De este modo se simplificó la jerarquía de anidamiento de los factores aleatorios que resultó para cada cultivo: bloque/labranza/fertilización. Los factores fijos del modelo fueron labranza y fertilización.

Al comparar modelos se utilizó el criterio REML para determinar la importancia de efectos aleatorios y el criterio ML para efectos fijos. Además, para las comparaciones de modelos también se calculó el criterio de Akaike (AIC). Las características principales del modelo completo se muestran en el cuadro 2 (a), y el modelo reducido en 2 (b). En cada caso se verificaron los cumplimientos de los supuestos de independencia y homogeneidad de las varianzas, de normalidad de la distribución de los errores y de la ausencia de multicolinealidad entre variables predictoras. Estos supuestos no se cumplieron en el caso del número de copias de 16S ARNr bacteriano por gramo de suelo (medido por PCR cuantitativa) y por ello se transformaron los valores de la variable respuesta en logaritmo decimal.

El análisis de variación temporal de las comunidades microbianas se realizó en función de las etapas de la secuencia agronómica y o en función de los años de utilización. La variación temporal de las comunidades microbianas, debida por ejemplo a cambios en los niveles de nutrientes está bien documentada (Bossio y col., 1998; Wardle, 1998; Debosz y col., 1999; Rogers y Tate, 2001; Smit y col., 2001; Elfstrand y col., 2007; Kramer y col., 2013). Sin embargo, un estudio de larga duración con constancia de manejos como el de Gral. Villegas puede considerarse en un estado cuasi-estacionario, al menos sobre escalas temporales cortas, como pueden ser dos o tres años. Esto está sustentado por la poca variación en los rendimientos desde al menos diez años previos a primer muestreo (Barraco y col., 2004; Díaz-Zorita y col., 2004; Alvarez y col., 2006; Barraco y col., 2006). Por otro lado, y a pesar de que los años de uso quedaron en orden inverso: pre-cosecha (22 años, 2013), post-cosecha (21 años, 2012) y barbecho (20 años, 2011), decidimos ordenarlo de este modo dado que, a nuestro entender, facilita la interpretación de los resultados a diferencia del orden: barbecho (2011), post-cosecha (2012) y pre-cosecha (2013). Para las comparaciones entre las distintas etapas de la secuencia agronómica, se añadió el factor “etapa” en la jerarquía de los factores aleatorios y también como factor fijo (Cuadro 2c). Además se realizaron comparaciones entre post- y pre-cosecha con el paquete CONTRAST v0.21 de R. En el caso del modelo temporal la validación del modelo se realizó mediante el procedimiento de análisis para medidas repetidas en el tiempo con intervalos desiguales.

Como ejemplo de análisis entre los tratamientos de labranza y fertilización se presentan los detalles del modelo completo en el cuadro A1.1 (Apéndice 1) para el logaritmo decimal del número de copias de 16S bacteriano por gramo de suelo. Para la misma variable respuesta también se presentan los detalles del análisis de la variación temporal entre las etapas agronómicas evaluadas (Cuadro A1.2, Apéndice 1).

Cuadro 2: Diseño genérico de los modelos de efectos mixtos en R software para comparación entre tratamientos: completo (a) y reducido (c) con contrastes entre SD y LV para modelo completo (b) y reducido (d) y modelo de comparación entre etapas (e):

- | |
|---|
| <p>a) Modelo completo:
 efectos fijos: labranza, fertilización
 efectos aleatorios (anidamiento): bloque / labranza / fertilización</p> <p>b) Modelo reducido:
 efecto fijo: labranza
 efecto aleatorio (anidamiento): bloque</p> <p>c) Modelo temporal (variaciones a lo largo de la secuencia agronómica):
 efecto fijo: etapa
 efectos aleatorios (anidamiento): bloque / labranza / fertilización / sitio / etapa</p> |
|---|

Capítulo 3

RESULTADOS

3.1. Parámetros de fertilidad físico-química

Los parámetros físico-químicos del suelo evaluados fueron los contenidos de arena, arcilla y limo; materia orgánica, nitrógeno total, relación carbono/nitrógeno, fósforo extractable y pH. La composición de partículas, los contenidos de materia orgánica y nitrógeno se evaluaron en el año 2012 en lotes en post-cosecha. El fósforo extractable y pH se evaluaron tanto en 2012 (post-cosecha) como en 2013 (pre-cosecha).

Cuadro 3: Contenidos promedio y desvíos estándar de arcilla, arena y limo en suelos con siembra directa (SD), labranza vertical (LV) y labranza convencional (LC) evaluados en post-cosecha:

Labranza	Arcilla %			Arena %			Limo %		
SD	17,24	± 1,81	<i>a</i>	49,32	± 5,33	<i>a</i>	33,44	± 3,82	<i>a</i>
LV	15,80	± 1,08	<i>b</i>	51,59	± 3,82	<i>a</i>	32,60	± 3,06	<i>b</i>
LC	16,08	± 2,33	<i>b</i>	48,95	± 6,13	<i>a</i>	34,98	± 4,56	<i>a</i>

Letras distintas indican diferencias significativas a un valor de *p* crítico de 0,05 entre los tratamientos de labranza (contrastes realizados sobre modelos lineales mixtos).

Cuadro 4: Valores promedios y desvíos estándar de pH y fósforo extractable en suelos con maíz (a) y soja (b) sin fertilizar (NF) y fertilizados (F) con fosfato mono-amónico en pre- y post-cosecha:

a) Maíz:

Parámetro	Fertilización	Pre-cosecha		Post-cosecha	
P extractable	NF	44,63	± 15,94 <i>b</i>	21,00	± 11,08 <i>b</i>
	F	63,98	± 18,73 <i>a</i>	57,74	± 12,31 <i>a</i>
pH	NF	5,82	± 0,16 <i>b</i>	5,70	± 0,23 <i>a</i>
	F	5,99	± 0,19 <i>a</i>	5,71	± 0,22 <i>a</i>

b) Soja:

Parámetro	Fertilización	Pre-cosecha		Post-cosecha	
P extractable	NF	25,03	± 16,46 <i>b</i>	11,13	± 7,28 <i>b</i>
	F	47,84	± 20,30 <i>a</i>	29,38	± 6,14 <i>a</i>
pH	NF	5,97	± 0,19 <i>a</i>	5,80	± 0,22 <i>b</i>
	F	5,96	± 0,19 <i>a</i>	5,95	± 0,14 <i>a</i>

Letras distintas indican diferencias significativas a un valor *p* crítico de 0,05 entre los tratamientos de fertilización para la misma etapa de la secuencia agronómica (contrastes realizados sobre modelos lineales mixtos).

Según la composición porcentual de partículas de diferente tamaño todos los suelos resultaron de textura franca a franco-arenosa con alrededor de 16% de arcilla, 50% de arena y 34% de limo en promedio. No obstante, se observaron diferencias en cuanto a los contenidos de partículas finas entre los tratamientos de labranza (Cuadro 3). Estas diferencias no fueron lo suficientemente relevantes para que ocurra un cambio textural entre los diferentes tipos de labranza. Se observó mayor contenido de arcilla en suelos con siembra directa (SD) siendo la magnitud de las diferencias de 8,3% entre labranza vertical (LV) y SD y de 6,7% entre SD y labranza convencional (LC). El contenido de limo fue en significativamente menor en LV, en promedio 5,6%, que en SD y LC, sin diferencias entre estos últimos dos manejos. No se detectaron diferencias significativas en los contenidos de arena entre los tratamientos de labranza. Cabe destacar que las características texturales son de carácter relativamente permanente y difícilmente serían afectadas por el cultivo antecesor o la rotación reciente de cultivos, así como por la fertilización. Es por ello que no se realizaron comparaciones para estos tratamientos.

Cuadro 5: Contenidos promedio y desvíos estándar de materia orgánica (MO), nitrógeno total (N total) y la relación entre carbono y nitrógeno (C/N) en suelos con maíz (a) y soja (b) con siembra directa (SD), labranza vertical (LV) y labranza convencional (LC) en post-cosecha:

a) Maíz:

Labranza	MO (%)	N total (%)	C/N
SD	2,72 ± 0,59	0,15 ± 0,04	10,38 ± 1,27
LV	2,73 ± 0,45	0,16 ± 0,01	10,78 ± 1,76
LC	3,00 ± 0,35	0,16 ± 0,01	10,93 ± 1,40

b) Soja:

Labranza	MO (%)	N total (%)	C/N
SD	2,60 ± 0,54	0,14 ± 0,03	10,78 ± 0,77
LV	2,15 ± 0,54	0,12 ± 0,03	10,94 ± 0,73
LC	1,84 ± 0,65	0,11 ± 0,03	9,96 ± 0,71

Los únicos parámetros de fertilidad química que presentaron diferencias significativas entre tratamientos fueron el fósforo extractable y el pH (Cuadro 4), ambos en respuesta a los tratamientos de fertilización. El primero mostró valores considerablemente superiores en lotes fertilizados (F) que en lotes sin fertilización (NF) en ambos cultivos. Estas diferencias se observaron tanto en pre- como en post-cosecha. Con respecto al pH, a pesar de observarse diferencias estadísticas en algunos casos (Cuadro 4), estas no fueron lo suficientemente relevantes desde el punto de vista agronómico. Según los estándares de clasificación para la Región Pampeana Argentina (Cosentino, 2015) estos suelos resultaron moderadamente ácidos (5,5-6) y sin deficiencias de fósforo con contenidos elevados (>20 ppm) en lotes fertilizados y moderados (7-20 ppm) en lotes sin fertilización. Sin embargo, como se muestra más adelante (Cuadro 6) sí se observaron efectos de la fertilización en los rendimientos de los cultivos.

Los contenidos de materia orgánica (MO), nitrógeno total (N total) y la relación entre carbono y nitrógeno (C/N) no mostraron respuesta a los tratamientos de labranza y a la fertilización (Cuadro 5). Agronómicamente, según los estándares para la Argentina, resultaron ser suelos de contenido de MO entre elevado (2,6-3,5%) e intermedio (2-2,5%) con bajo contenidos de nitrógeno total (0,1-0,2%) y relación C/N cercana a 10.

3.2. Rendimientos de los cultivos

Los rendimientos de los cultivos se evaluaron en la cosecha de 2011, 2012 y 2013 y el único factor que tuvo efectos sobre los rendimientos en los años muestreados fue la fertilización. Las diferencias significativas se observaron a favor de los lotes fertilizados en 2013 para maíz y en 2012 para soja con incrementos por fertilización de 14% y 13% respectivamente. A pesar de no ser significativamente diferentes los rendimientos de ambos cultivos en lotes fertilizados fueron en unos 8% superiores en la cosecha de 2011.

Cuadro 6: Rendimientos (T/ha) promedio y desvíos estándar de los cultivos de maíz (a) y soja (b) sin (NF) y con fertilización (F) en las cosechas de 2011, 2012 y 2013:

a) Maíz:

Fertilización	2011 (T/ha)	2012 (T/ha)	2013 (T/ha)
NF	10,58 ± 1,45 <i>a</i>	4,06 ± 1,63 <i>a</i>	8,71 ± 1,40 <i>b</i>
F	11,59 ± 1,06 <i>a</i>	4,67 ± 1,93 <i>a</i>	10,12 ± 1,06 <i>a</i>

A

C

B

b) Soja:

Fertilización	2011 (T/ha)	2012 (T/ha)	2013 (T/ha)
NF	4,12 ± 0,62 <i>a</i>	3,24 ± 0,98 <i>b</i>	3,67 ± 0,74 <i>a</i>
F	4,48 ± 0,59 <i>a</i>	3,73 ± 0,72 <i>a</i>	3,66 ± 0,47 <i>a</i>

A

AB

B

Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos de fertilización (minúsculas) para el mismo año de cosecha y entre años (mayúsculas) a un valor *p* crítico de 0,05 (contrastes realizados sobre modelos lineales mixtos).

En el cuadro 6 también se observó la magnitud de las variaciones de los rendimientos entre años, así como letras mayúsculas correspondientes a los contrastes en los valores promedios. El año 2012 resultó atípicamente lluvioso (Figura 3) causando una considerable pérdida de los rendimientos de maíz y sin afectar en gran medida a los de soja. Además, debido el exceso de precipitaciones en los últimos meses del año 2012 se retrasó la siembra en la campaña 2012-13. Este atraso en consecuencia causó una pérdida de rendimientos en la cosecha de 2013. La evolución de las precipitaciones se ve en la figura 3, donde también se incluyeron las del año 2010. Específicamente, octubre (10) y noviembre (11) de 2012 presentaron valores de precipitación atípicamente elevados.

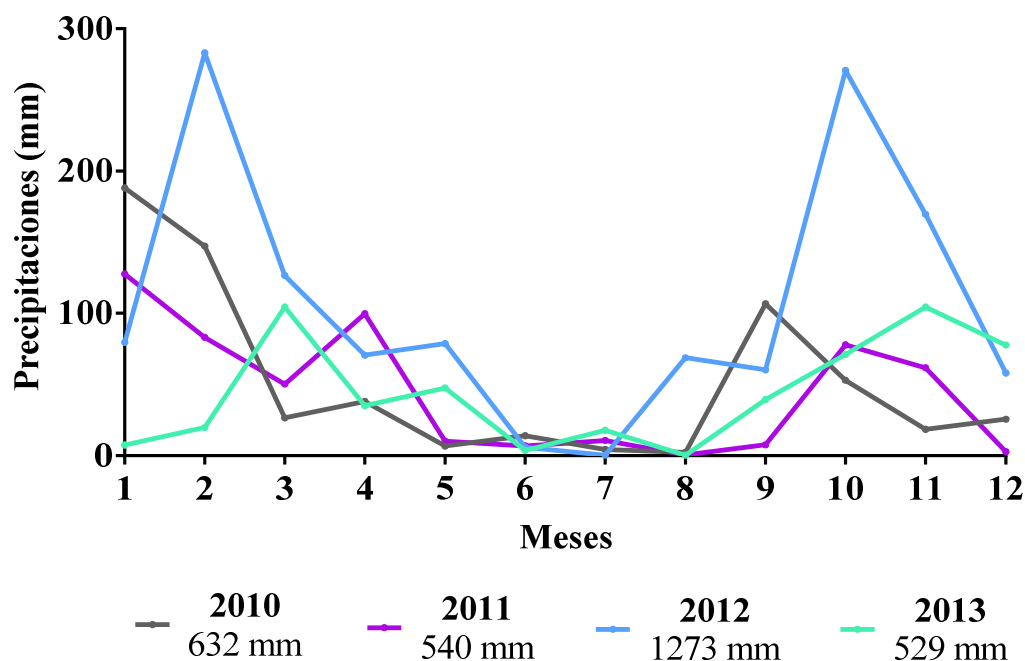


Figura 3: Precipitaciones en General Villegas en 2010, 2011, 2012 y 2013. Debajo de cada año se indica el total anual de precipitaciones.

3.3. Estructura genética de las comunidades bacterianas

Uno de los objetivos de este trabajo fue determinar si los manejos agronómicos (cultivo, tipo de labranza y fertilización) inducen cambios en la estructura de la comunidad bacteriana. Para ello se emplearon dos metodologías (DGGE y qPCR) con cebadores para el gen que codifica el ARN ribosomal (16S ARNr) que es un marcador taxonómico molecular para bacterias. Con la técnica de DGGE se separan los fragmentos amplificados del gen 16S ARNr de la comunidad bacteriana del suelo en base a su secuencia, por lo que permite determinar cambios en la composición de la comunidad, mientras que con la técnica de qPCR puede cuantificarse la cantidad de copias de éste por gramo de suelo y permite estimar la abundancia de bacterias.

3.3.1. *Perfiles genéticos bacterianos*

Las matrices de los perfiles de presencia e intensidad de bandas de las comunidades bacterianas obtenidas con la técnica de DGGE fueron analizadas con el método multivariado NMDS y representadas en un ordenamiento bidimensional. Los valores de estrés del NMDS resultaron menores a 0,2 lo que indica una baja distorsión de la representación gráfica respecto a la matriz de distancias de Bray-Curtis (Figura 4). Del análisis surge que de los cuatro factores evaluados (cultivo, tipo de labranza, fertilización y etapa del ciclo agronómico), el único que tuvo efecto en la separación de las comunidades fue el tipo de labranza (Figura 4). En los tres momentos del ciclo agrícola y para ambos cultivos hubo una clara separación de las comunidades de SD y

LC. Por otro lado, las comunidades de lotes con LV en cada caso tendieron a parecerse a alguna de las otras dos labranzas. Además, en todas las etapas agronómicas y para ambos cultivos, las comunidades de LC fueron muy similares entre sí.

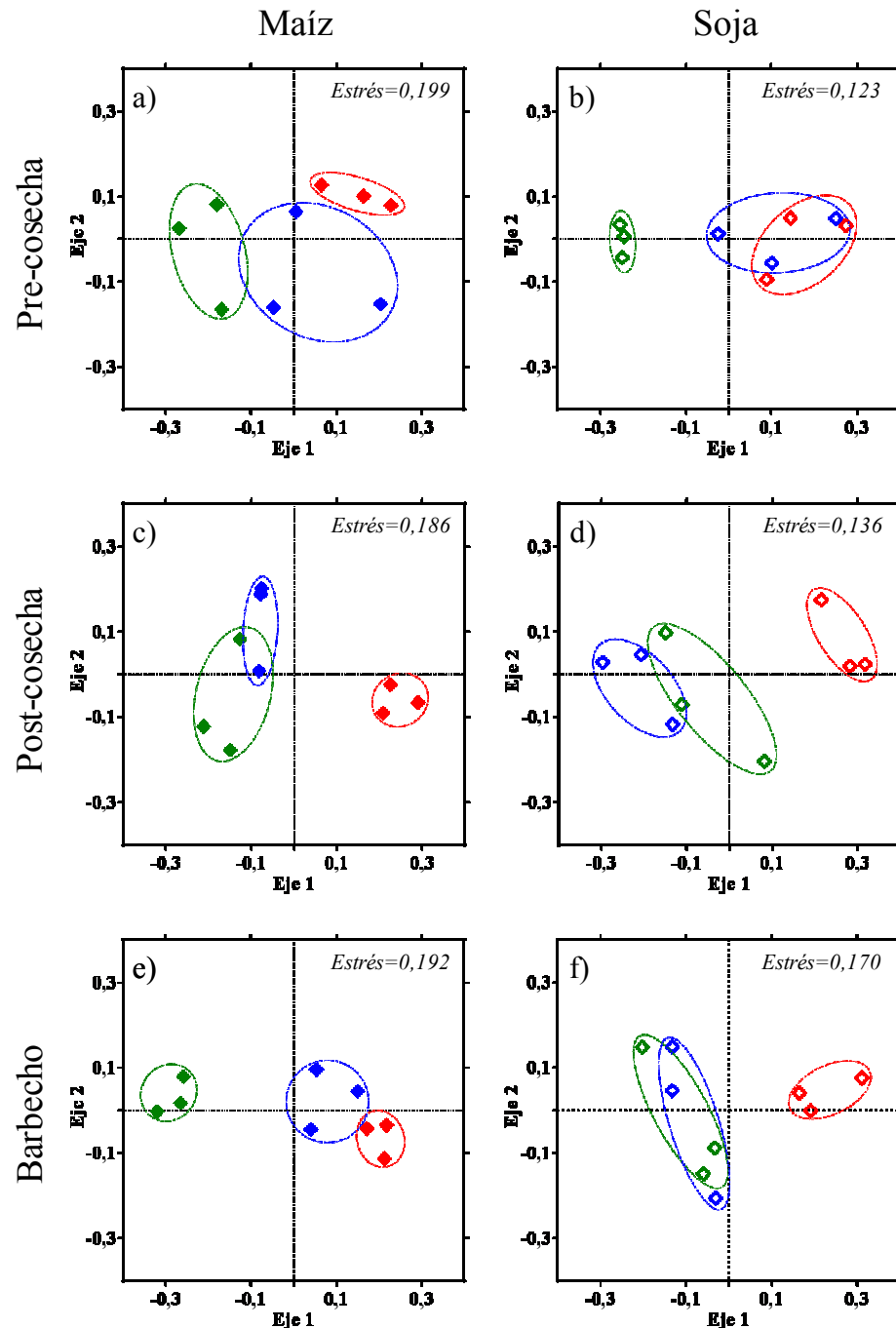


Figura 4: Representación gráfica del análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) empleando distancias de Bray-Curtis a partir de los perfiles genéticos bacterianos de DGGE (16S ARNr) en pre-cosecha (a, b), post-cosecha (c, d) y barbecho (e, f) en suelos con cultivo de maíz (a, c, e) y soja (b, d, f) con tratamientos de SD (verde), LV (azul) y LC (rojo). Los puntos representan los 3 bloques bajo el mismo tratamiento. En el ángulo superior derecho se indican los valores de estrés del análisis.

Cuadro 7: Valores del estadístico R de los contrastes entre siembra directa (SD), labranza vertical (LV) y labranza convencional (LC) realizados con el Análisis de Similitudes (ANOSIM) usando distancias de Bray-Curtis partir de los perfiles de bandas de 16S ARNr bacteriano en pre-cosecha (a), post-cosecha (b) y barbecho (c) en suelos con cultivo de maíz y soja:

a) Pre-cosecha:

Maíz	Bloque 4	Bloque 5	Bloque 6	Soja	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3
LC vs. SD	0,813 *	0,760 *	0,427	LC vs. SD	0,750 *	0,208	0,542
LC vs. LV	0,198	0,573 *	0,427 *	LC vs. LV	0,063	0,010	0,510 *
LV vs. SD	0,313	0,823 *	0,156 *	LV vs. SD	0,073	0,240	0,313

b) Post-cosecha:

Maíz	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 2	Soja	Bloque 4	Bloque 5	Bloque 6
LC vs. SD	0,823 *	0,469 *	1,000 *	LC vs. SD	0,531 *	0,854 *	0,802 *
LC vs. LV	0,542 *	0,385	0,750 *	LC vs. LV	0,552 *	0,875 *	0,510 *
LV vs. SD	0,552 *	0,135	0,531 *	LV vs. SD	0,427 *	0,344	0,313 *

c) Barbecho:

Maíz	Bloque 4	Bloque 5	Bloque 6	Soja	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3
LC vs. SD	0,938 *	0,948 *	0,615 *	LC vs. SD	0,260	0,396 *	0,907 *
LC vs. LV	0,115	0,000	0,104	LC vs. LV	0,250	0,271	0,870 *
LV vs. SD	0,219	0,625 *	0,552 *	LV vs. SD	0,656 *	0,063	0,531 *

Los asteriscos indican la significancia del estadístico R a un valor p crítico de 0,05 entre los tratamientos de labranza para el mismo bloque.

Se detectaron diferencias en el estadístico R para diferentes tipos de labranza (Cuadro 7) y variaciones importantes entre los bloques individuales de cada tratamiento. No obstante, a pesar de estas variaciones, se observó un patrón: en promedio los valores R son mayores, lo que destaca una mayor magnitud de diferencias estructurales, para las comparaciones entre LC con SD que para las otras dos (LC vs. LV y SD vs. LV). Este comportamiento fue más marcado para maíz que para soja. Finalmente, no observamos efecto de la fertilización sobre los perfiles de bacterias.

3.3.2. *Índices de biodiversidad derivados de los perfiles de DGGE*

En la sección anterior se mostró el uso de las matrices derivadas de los ensayos de DGGE, que registran la ausencia o presencia de bandas y su intensidad, para obtener perfiles genéticos para cada comunidad. Estas matrices además permiten calcular índices de biodiversidad tales como la riqueza, la equitatividad y el índice de diversidad de Simpson de las comunidades bajo diferentes tratamientos (ver sección ecuaciones 1 y 2 en Materiales y Métodos).

Cuadro 8: Índices de biodiversidad genética bacteriana calculados a partir de los datos de DGGE del 16S ARNr en suelos con maíz (a) y soja (b) con siembra directa (SD), labranza vertical (LV) y labranza convencional (LC) en tres etapas de la secuencia agronómica:

a) Maíz:

Variable	Labranza	Pre-cosecha		Post-cosecha		Barbecho	
Riqueza	SD	19,25 ±	6,12 <i>b</i>	24,00 ±	10,14 <i>a</i>	31,42 ±	9,32 <i>a</i>
	LV	21,42 ±	5,45 <i>ab</i>	22,83 ±	10,84 <i>a</i>	33,25 ±	6,22 <i>a</i>
	LC	23,58 ±	6,72 <i>a</i>	24,83 ±	10,49 <i>a</i>	32,17 ±	6,94 <i>a</i>
Equitatividad	SD	0,81 ±	0,03 <i>a</i>	0,75 ±	0,07 <i>a</i>	0,74 ±	0,07 <i>a</i>
	LV	0,82 ±	0,07 <i>a</i>	0,75 ±	0,11 <i>a</i>	0,74 ±	0,08 <i>a</i>
	LC	0,82 ±	0,07 <i>a</i>	0,79 ±	0,08 <i>a</i>	0,74 ±	0,04 <i>a</i>
Diversidad de Simpson	SD	0,92 ±	0,02 <i>b</i>	0,92 ±	0,04 <i>a</i>	0,94 ±	0,03 <i>a</i>
	LV	0,93 ±	0,02 <i>b</i>	0,92 ±	0,03 <i>a</i>	0,94 ±	0,03 <i>a</i>
	LC	0,94 ±	0,02 <i>a</i>	0,93 ±	0,02 <i>a</i>	0,94 ±	0,02 <i>a</i>

b) Soja:

Variable	Labranza	Pre-cosecha		Post-cosecha		Barbecho	
Riqueza	SD	20,92 ±	5,05 <i>a</i>	25,75 ±	5,17 <i>a</i>	25,33 ±	4,92 <i>a</i>
	LV	19,92 ±	3,53 <i>a</i>	22,17 ±	4,43 <i>b</i>	25,58 ±	5,12 <i>a</i>
	LC	20,17 ±	5,10 <i>a</i>	20,50 ±	5,76 <i>b</i>	24,17 ±	3,45 <i>a</i>
Equitatividad	SD	0,73 ±	0,20 <i>a</i>	0,71 ±	0,06 <i>a</i>	0,68 ±	0,07 <i>a</i>
	LV	0,75 ±	0,08 <i>a</i>	0,66 ±	0,07 <i>a</i>	0,70 ±	0,08 <i>a</i>
	LC	0,80 ±	0,07 <i>a</i>	0,68 ±	0,06 <i>a</i>	0,71 ±	0,07 <i>a</i>
Diversidad de Simpson	SD	0,88 ±	0,13 <i>a</i>	0,93 ±	0,02 <i>a</i>	0,92 ±	0,02 <i>a</i>
	LV	0,92 ±	0,02 <i>a</i>	0,91 ±	0,03 <i>b</i>	0,93 ±	0,02 <i>a</i>
	LC	0,92 ±	0,03 <i>a</i>	0,90 ±	0,03 <i>b</i>	0,93 ±	0,02 <i>a</i>

Letras distintas indican diferencias significativas a un valor *p* crítico de 0,05 entre los tratamientos de labranza para la misma etapa de la secuencia agronómica (contrastes realizados sobre modelos lineales mixtos).

En el cuadro 8 se muestran los índices de biodiversidad determinados para los tres tipos de laboreo en los tres momentos de la secuencia agronómica. En análisis previos se determinó que la fertilización no afectó a estos índices y en consecuencia se omitió esta variable. Las diferencias más contrastantes entre índices tendieron a ocurrir entre SD y LC en la pre-cosecha de maíz y en la post-cosecha de soja. Si bien algunas otras diferencias resultaron significativas estadísticamente, la magnitud de éstas no siempre fue relevante desde el punto de vista ecológico. Estos casos son del índice de diversidad de Simpson en pre-cosecha de maíz, donde la magnitud de la diferencia entre SD y LC fue de 2%, y en post-cosecha en soja, con una magnitud de 3%. Sin embargo, las diferencias en riqueza para estos mismos tratamientos fueron de mayor magnitud. En pre-cosecha de maíz la riqueza en LC fue un 22,5% mayor que en SD, mientras que en post-cosecha de soja este patrón se invirtió, siendo la riqueza un 25,6% mayor en SD que en LC. No se observaron diferencias en la equitatividad de bacterias en ninguno de los casos evaluados.

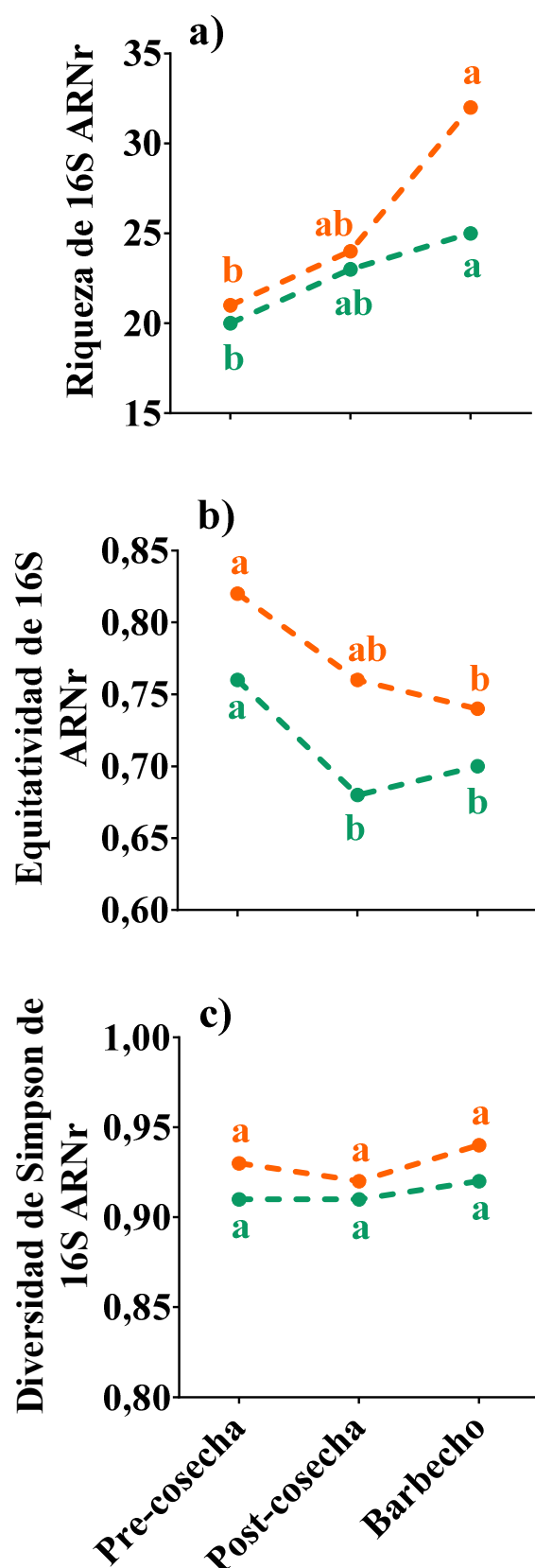


Figura 5: Evolución de los índices de biodiversidad genética bacteriana (DGGE de 16S ARNr) a lo largo de las tres etapas de la secuencia agronómica: pre-cosecha, post-cosecha y barbecho para maíz (naranja) y soja (verde). Para cada etapa se promediaron los datos de los tratamientos. Letras distintas indican diferencias significativas a un valor p crítico de 0,05 entre las etapas para el mismo cultivo (contrastes realizados sobre modelos lineales mixtos).

Al evaluar la evolución de los índices de biodiversidad a lo largo de la secuencia agronómica se observó un incremento en la riqueza de las comunidades microbianas para ambos cultivos desde pre-cosecha hasta barbecho, siendo intermedia en post-cosecha (Figura 5). La equitatividad, en cambio, mostró una disminución a lo largo de esa misma secuencia. Estas modificaciones en la riqueza y equitatividad a lo largo de la secuencia agronómica no se reflejaron en la diversidad bacteriana general (índice de Simpson) ya que ésta no difirió en las tres etapas evaluadas.

3.3.3. *Cuantificación del número de copias del 16S ARNr*

Cuadro 9: Logaritmo decimal del número de copias de 16S ARNr en suelos con maíz (a) y soja (b) con siembra directa (SD), labranza vertical (LV) y labranza convencional (LC) en las tres etapas agronómicas:

a) Maíz:

Labranza	Pre-cosecha	Post-cosecha	Barbecho
SD	8,80 ± 0,34	8,61 ± 0,30	8,00 ± 0,44
LV	8,83 ± 0,37	8,42 ± 0,28	8,01 ± 0,28
LC	8,70 ± 0,45	8,33 ± 0,24	7,89 ± 0,24

b) Soja:

Labranza	Pre-cosecha	Post-cosecha	Barbecho
SD	8,82 ± 0,39	8,35 ± 0,36	7,99 ± 0,20
LV	8,74 ± 0,18	8,26 ± 0,34	7,94 ± 0,16
LC	8,67 ± 0,22	8,20 ± 0,28	7,86 ± 0,26

Para el análisis, los valores del número de copias del gen 16S ARNr por gramo de suelo seco fueron transformados mediante el logaritmo decimal para corregir la gran variabilidad que presentan este tipo de datos.

Según lo observado en el análisis (Cuadro 9) el número de copias de 16S ARNr bacteriano no difirió significativamente entre los tratamientos de labranza. Tampoco se observaron diferencias debidas a los tratamientos de fertilización (datos no mostrados).

En la evolución del número de copias del gen a lo largo de las etapas de la secuencia agronómica se observó una disminución desde pre-cosecha a barbecho (Figura 6). Este descenso fue similar en ambos cultivos y con un patrón prácticamente lineal.

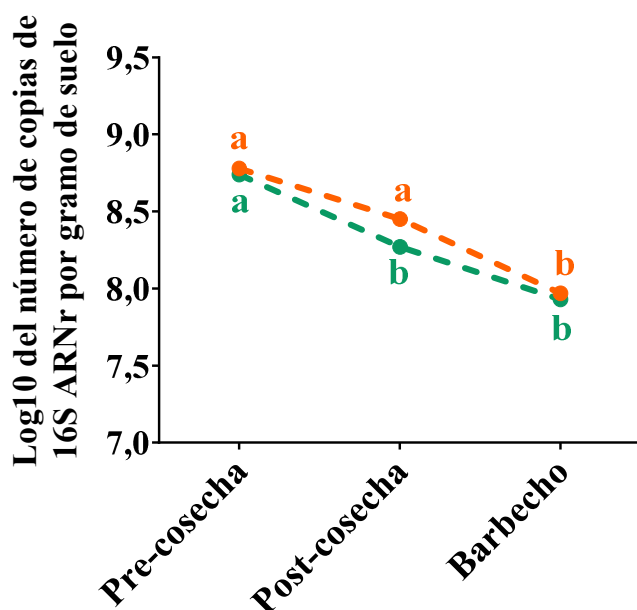


Figura 6: Logaritmo decimal del número de copias de 16S ARNr por gramo de suelo a lo largo de las tres etapas de la secuencia agronómica: pre-cosecha, post-cosecha y barbecho para maíz (naranja) y soja (verde). Para cada etapa se agruparon los datos de los tratamientos. Letras distintas indican diferencias significativas a un valor p crítico de 0,05 entre las etapas para el mismo cultivo (contrastes realizados sobre modelos lineales mixtos).

3.4. Consumo de sustratos carbonados por las comunidades microbianas del suelo

3.4.1. Perfiles fisiológicos a partir del consumo de sustratos carbonados

Los perfiles catabólicos de las comunidades microbianas se evaluaron mediante consumo diferencial de sustratos carbonados en microplacas. Esta metodología detecta la actividad catabólica de microorganismos heterotróficos cultivables de rápido crecimiento. Para tal fin se emplearon 12 sustratos en post-cosecha y barbecho y 24 sustratos para la etapa de pre-cosecha. Los datos obtenidos a las 72 horas desde el inicio de la incubación se analizaron por el método multivariado de Componentes Principales (ACP), por separado para cada cultivo y cada etapa de la secuencia agronómica. De los sustratos empleados 10 fueron repetidos en las tres etapas evaluadas y con estos se efectuó un ACP conjunto para la evaluación de la dinámica de las comunidades microbianas a lo largo de la secuencia.

En el cuadro 8 se muestran los índices de biodiversidad determinados para los tres tipos de laboreo en los tres momentos de la secuencia agronómica. En análisis previos se determinó que la fertilización no afectó a estos índices y en consecuencia se omitió esta variable. Las diferencias más contrastantes entre índices tendieron a ocurrir entre SD y LC en la pre-cosecha de maíz y en la post-cosecha de soja. Si bien algunas otras diferencias resultaron significativas estadísticamente, la magnitud de éstas no

siempre fue relevante desde el punto de vista ecológico. Estos casos son del índice de diversidad de Simpson en pre-cosecha de maíz, donde la magnitud de la diferencia entre SD y LC fue de 2%, y en post-cosecha en soja, con una magnitud de 3%. Sin embargo, las diferencias en riqueza para estos mismos tratamientos fueron de mayor magnitud. En pre-cosecha de maíz la riqueza en LC fue un 22,5% mayor que en SD, mientras que en post-cosecha de soja este patrón se invirtió, siendo la riqueza un 25,6% mayor en SD que en LC. No se observaron diferencias en la equitatividad de bacterias en ninguno de los casos evaluados.

Cuadro 10: Correlación entre las variables originales con los ejes CP1 y CP2 derivados del análisis de componentes principales a partir del consumo diferencial de sustratos carbonados en suelos con maíz y soja en las tres etapas agronómicas: pre-cosecha (a), post-cosecha y barbecho (b):

a)

Sustrato	Maíz		Soja		Sustrato	Maíz		Soja	
	CP1	CP2	CP1	CP2		CP1	CP2	CP1	CP2
Glucosa	0,66	-0,23	0,88	0,06	Prolina	0,80	-0,11	0,84	-0,15
Manosa	0,65	-0,41	0,82	-0,04	Fenilalanina	0,70	0,33	0,65	-0,18
Sacarosa	0,47	-0,33	0,69	0,44	Ác. quínico	0,72	0,11	0,62	-0,03
Fructosa	0,53	-0,02	0,58	0,51	Ác. glutárico	0,48	0,40	0,80	-0,21
Xilosa	0,69	-0,20	0,76	0,25	Ác. itaconico	0,52	0,11	0,49	0,25
Arabinosa	0,57	0,03	0,47	0,25	Ác. galacturónico	0,55	0,16	0,29	-0,29
Celobiosa	0,57	-0,21	0,44	0,58	Ác. glutámico	0,33	0,60	0,67	-0,28
Manitol	0,61	-0,46	0,78	-0,29	Ác. cumárico	0,46	-0,51	0,41	0,15
Triptofano	0,58	0,34	0,61	-0,34	Ác. cafeico	-0,05	0,35	-0,11	0,00
Asparragina	0,54	-0,26	0,70	0,30	Tween 80	0,38	0,14	0,69	-0,16
Arginina	0,74	0,33	0,75	-0,35	Tween 20	0,28	0,43	0,57	0,03
Lisina	0,56	-0,03	0,46	-0,52	Putrescina	0,49	0,53	0,87	0,01

b)

Sustrato	Post-cosecha				Barbecho			
	Maíz		Soja		Maíz		Soja	
	CP1	CP2	CP1	CP2	CP1	CP2	CP1	CP2
Glucosa	0,13	-0,02	0,74	-0,41	0,76	-0,55	0,54	0,31
Manosa	0,15	0,14	0,04	-0,34	0,80	-0,20	0,80	0,24
Sacarosa	0,40	0,05	0,07	-0,11	0,64	0,38	0,48	-0,48
Glucosa-1-P	0,04	0,07	0,00	-0,49	0,48	0,40	0,47	-0,01
Triptofano	0,41	0,91	0,54	-0,20	0,51	0,58	0,68	-0,52
Asparragina	0,44	0,05	0,66	0,04	0,23	-0,30	0,42	0,27
Arginina	0,57	-0,17	0,81	-0,14	0,66	-0,43	0,42	0,69
Lisia	0,67	-0,33	0,20	0,82	0,72	0,30	0,75	-0,46
Ác. glutárico	0,71	-0,24	0,76	0,20	0,54	0,53	0,44	0,66
Ác. galacturónico	0,24	0,17	0,11	-0,34	0,79	-0,37	0,21	0,50
Ác. valérico	0,75	-0,32	0,74	0,10	0,54	0,30	0,86	-0,31
Tween 80	0,49	-0,02	-0,13	0,42	0,67	0,00	0,61	0,07

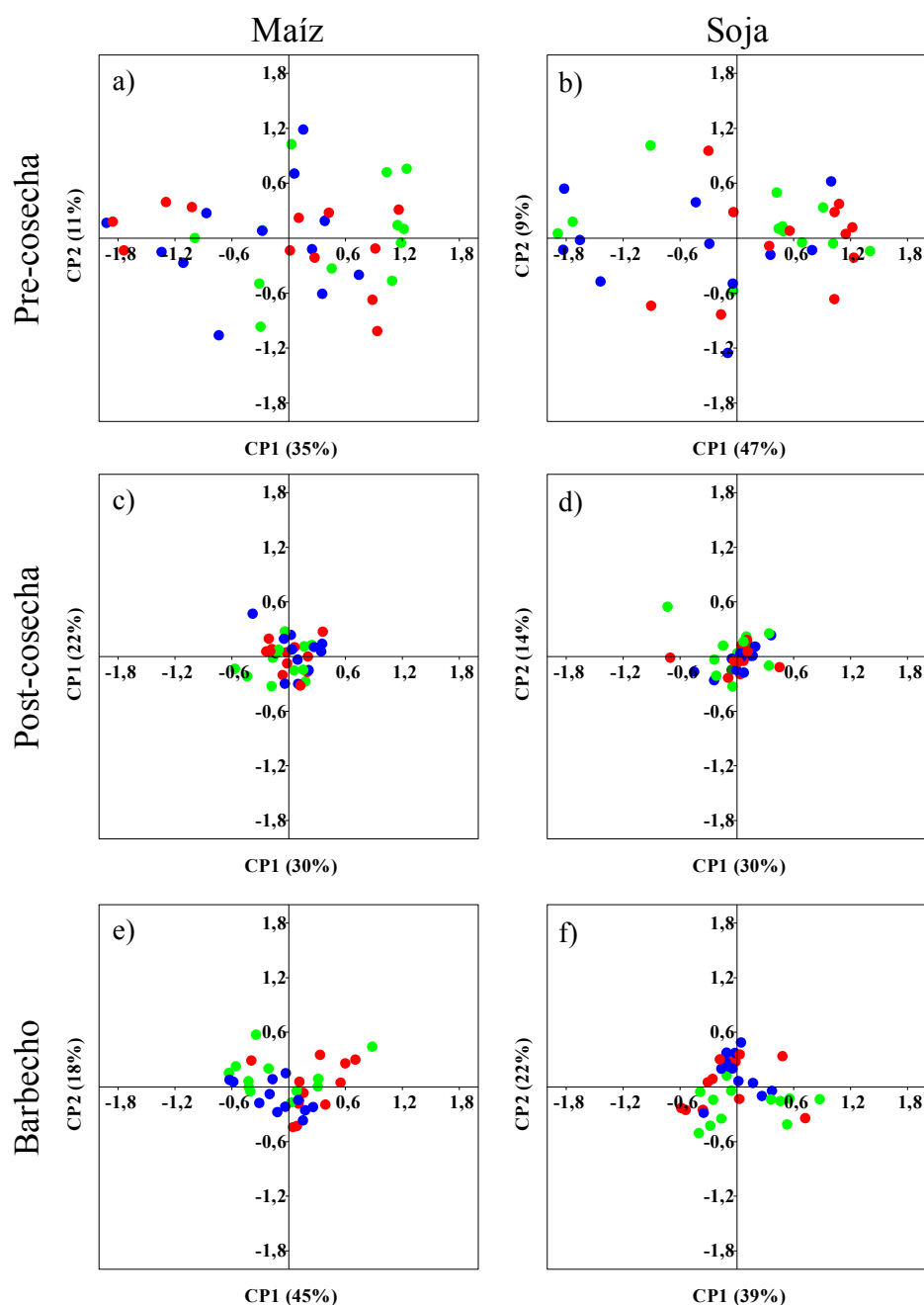


Figura 7: Representaciones gráficas de los análisis de componentes principales (ACP) del consumo diferencial de sustratos carbonados por las comunidades microbianas de suelos con maíz (a, c, e) y soja (b, d, f) con SD (verde), LV (azul) y LC (rojo), para las tres etapas de la secuencia agronómica: pre-cosecha, post-cosecha y barbecho posterior a la cosecha. Los datos corresponden a las lecturas a las 72 horas del inicio de la incubación de las microplacas.

En la figura 7 se muestran el ordenamiento obtenido con los dos primeros componentes del ACP de los datos de utilización de los diferentes sustratos carbonados por parte de las comunidades microbianas del suelo. No se observaron agrupamientos según el tipo de labranza, la fertilización (datos no presentados) o el cultivo. En cambio, se observan ciertas regularidades cuando se considera el momento del ciclo agronómico.

En el caso de pre-cosecha las comunidades de ambos cultivos, soja y maíz, mostraron una mayor heterogeneidad que en post-cosecha y barbecho.

Cuando se analizaron las correlaciones de los diferentes sustratos con los dos primeros componentes del ACP se observó que algunos sustratos comparten el signo y la magnitud de la correlación en ambos cultivos, especialmente para el eje 1, pero otros no (Cuadro 10). En cuanto a contribución de cada sustrato a los ejes del ACP, se determinó que los sustratos que mostraron más correlación con el eje 1 fueron: prolina, arginina, ácido quínico y fenilalanina en pre-cosecha; ácido valérico, ácido glutárico y lisina en post-cosecha; manosa, ácido galacturónico, glucosa y lisina en el barbecho posterior a la cosecha del maíz. En barbecho posterior al cultivo de soja estas variables fueron: glucosa, putrescina, prolina, manosa, ácido glutárico, manitol, fructosa, xilosa y arginina en pre-cosecha; arginina, ácido glutárico, ácido valérico y glucosa en post-cosecha; ácido valérico, manosa y lisina.

Para entender mejor la dinámica de la variación de los perfiles fisiológicos microbianos a lo largo de la secuencia agronómica se realizó un análisis de ACP considerando aquellos diez sustratos comunes a las mediciones en las tres fechas (Figura 8). El análisis conjunto nuevamente muestra la mayor heterogeneidad de las comunidades en pre-cosecha para ambos cultivos. Además, en soja se observó una superposición de los perfiles de post-cosecha y barbecho. Mientras en suelos con maíz esta superposición fue parcial. Además de una mayor heterogeneidad en los perfiles fisiológicos, las comunidades de post-cosecha también mostraron un mayor consumo, reflejado en los valores de absorbancia, que las de post-cosecha y barbecho, siendo este último el más bajo. Estas diferencias en el consumo se reflejan bien a través del PDC (Figura 10).

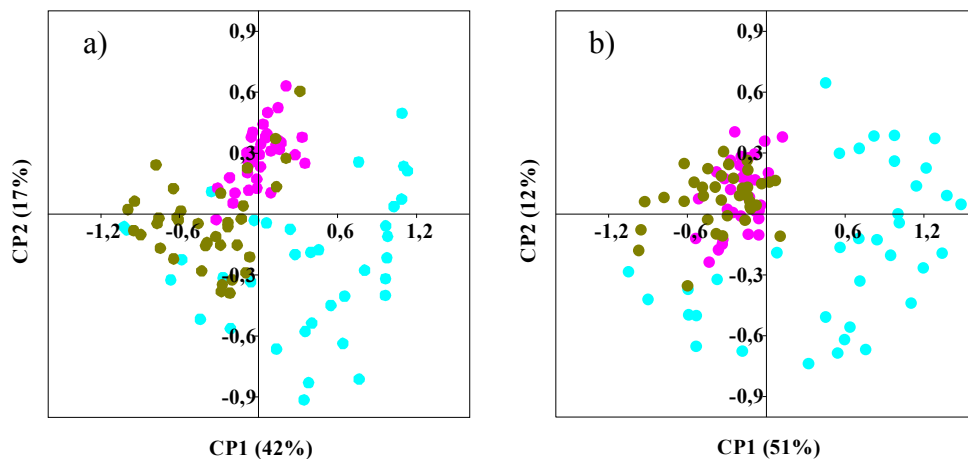


Figura 8: Representaciones gráficas de los análisis de componentes principales (ACP) a partir del consumo diferencial de sustratos carbonados por las comunidades microbianas de suelos con maíz (a) y soja (b) para las tres etapas de la secuencia agronómica en conjunto: pre-cosecha (turquesa) post-cosecha (fucsia) y barbecho (verde oliva). Los datos corresponden a las lecturas a las 72 horas del inicio de la incubación de las microplacas.

3.4.2. *Índices de biodiversidad a partir del consumo de los sustratos*

Las matrices de respuesta a los diferentes sustratos de cada tratamiento que se usaron para construir los ACP también se utilizaron para calcular índices de biodiversidad. Estos fueron: riqueza relativa, equitatividad e índice de diversidad de Simpson (ver ecuaciones 1 y 2 en Materiales y Métodos).

En el cultivo de maíz se observaron diferencias en el índice de diversidad de Simpson en post-cosecha y en barbecho (Cuadro 11), habiendo una menor diversidad metabólica en SD que en LV y LC en ambas etapas. Estas diferencias en post-cosecha fueron de una magnitud baja, alrededor de 2,2%, mientras en barbecho la diversidad en SD fue 36% inferior que en LC. En la post-cosecha del cultivo de soja la diversidad metabólica de Simpson en LV fue inferior (8,5%) a la de LC. Además, en LV se observó una menor equitatividad, pero esta diferencia fue de baja magnitud, 2%.

Cuadro 11: Índices de biodiversidad calculados a partir del consumo diferencial de sustratos carbonados por las comunidades microbianas de lotes con cultivo de maíz (a) y soja (b), en siembra directa (SD), labranza vertical (LV) y labranza convencional (LC), en los tres momentos de la secuencia agronómica:

a) Maíz:

Variable	Labranza	Pre-cosecha		Post-cosecha		Barbecho	
Riqueza	SD	16,83 ±	4,93 <i>a</i>	9,42 ±	1,83 <i>a</i>	3,83 ±	3,13 <i>a</i>
	LV	12,58 ±	4,72 <i>a</i>	10,25 ±	0,87 <i>a</i>	4,67 ±	2,67 <i>a</i>
	LC	12,92 ±	5,11 <i>a</i>	10,42 ±	0,67 <i>a</i>	5,92 ±	2,35 <i>a</i>
Equitatividad	SD	0,95 ±	0,02 <i>a</i>	0,96 ±	0,02 <i>a</i>	0,90 ±	0,28 <i>a</i>
	LV	0,93 ±	0,03 <i>a</i>	0,97 ±	0,02 <i>a</i>	0,88 ±	0,28 <i>a</i>
	LC	0,94 ±	0,02 <i>a</i>	0,96 ±	0,01 <i>a</i>	0,97 ±	0,02 <i>a</i>
Diversidad de Simpson	SD	0,93 ±	0,03 <i>a</i>	0,88 ±	0,03 <i>b</i>	0,50 ±	0,09 <i>b</i>
	LV	0,89 ±	0,06 <i>a</i>	0,90 ±	0,01 <i>a</i>	0,65 ±	0,11 <i>a</i>
	LC	0,84 ±	0,19 <i>a</i>	0,90 ±	0,01 <i>a</i>	0,78 ±	0,11 <i>a</i>

b) Soja:

Variable	Labranza	Pre-cosecha		Post-cosecha		Barbecho	
Riqueza	SD	16,80 ±	5,75 <i>a</i>	9,92 ±	2,02 <i>a</i>	6,17 ±	2,92 <i>a</i>
	LV	12,80 ±	6,89 <i>a</i>	8,33 ±	2,19 <i>a</i>	5,42 ±	1,16 <i>a</i>
	LC	18,50 ±	3,23 <i>a</i>	8,25 ±	3,19 <i>a</i>	5,50 ±	3,29 <i>a</i>
Equitatividad	SD	0,95 ±	0,01 <i>a</i>	0,96 ±	0,02 <i>a</i>	0,96 ±	0,03 <i>a</i>
	LV	0,93 ±	0,03 <i>b</i>	0,96 ±	0,02 <i>a</i>	0,97 ±	0,02 <i>a</i>
	LC	0,95 ±	0,01 <i>a</i>	0,96 ±	0,02 <i>a</i>	0,88 ±	0,08 <i>a</i>
Diversidad de Simpson	SD	0,92 ±	0,06 <i>ab</i>	0,88 ±	0,05 <i>a</i>	0,78 ±	0,13 <i>a</i>
	LV	0,86 ±	0,02 <i>b</i>	0,86 ±	0,06 <i>a</i>	0,79 ±	0,04 <i>a</i>
	LC	0,94 ±	0,01 <i>a</i>	0,84 ±	0,08 <i>a</i>	0,66 ±	0,22 <i>a</i>

Los datos corresponden a las lecturas a las 72 horas del inicio de la incubación de las microplacas. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos de labranza a un valor de *p* crítico de 0,05 para la misma etapa de la secuencia agronómica (contrastes realizados sobre modelos lineales mixtos).

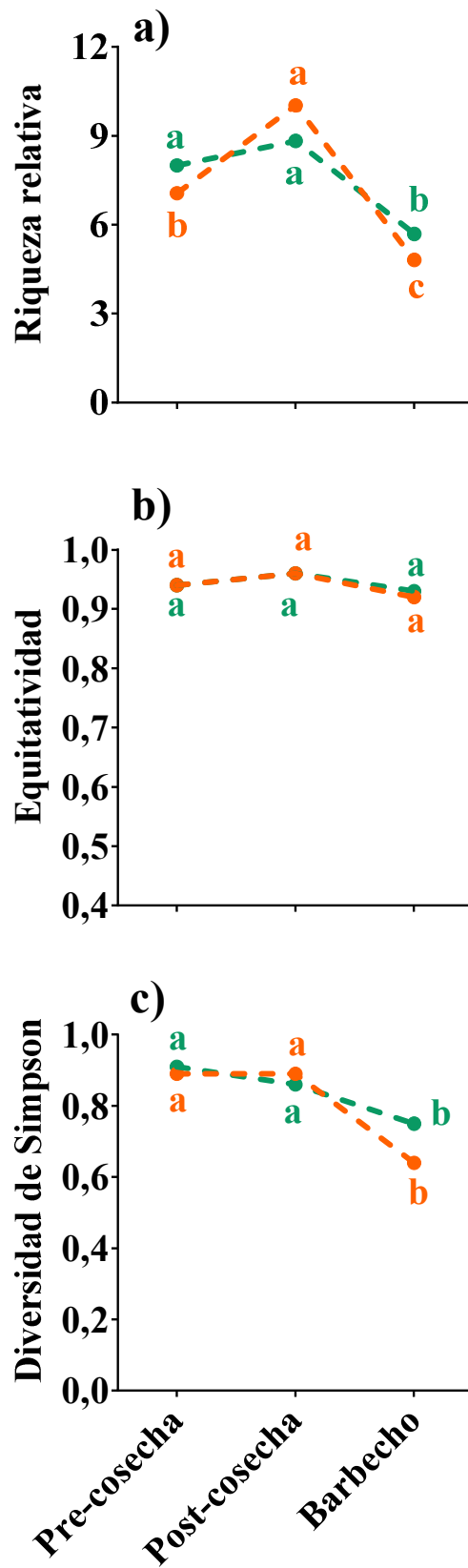


Figura 9: Evolución de los índices de biodiversidad metabólica calculados a partir del consumo diferencial de sustratos carbonados en las tres etapas de la secuencia agronómica: pre-cosecha, post-cosecha y barbecho para maíz (naranja) y soja (verde). Para cada etapa se agruparon los datos de los tratamientos. Los datos corresponden a las lecturas a las 72 horas del inicio de la incubación de las microplacas. Letras distintas indican diferencias significativas a un valor p crítico de 0,05 entre las etapas para el mismo cultivo con su correspondiente color (contrastes realizados sobre modelos lineales mixtos).

Se observaron patrones similares de variación de los índices ecológicos a lo largo de las etapas agronómicas en ambos cultivos (Figura 9). El índice de riqueza mostró un incremento entre pre- y post-cosecha solamente en maíz, disminuyendo de pre-cosecha a barbecho en ambos cultivos. Mientras la equitatividad se mantuvo sin cambios a lo largo de la secuencia agronómica, la diversidad metabólica global, estimada como índice de Simpson, mostró una disminución de post-cosecha a barbecho.

3.4.3. *Actividad microbiana derivada del consumo de los sustratos carbonados*

Cuadro 12: Promedios y desvíos estándar de desarrollo del color (PDC) calculados a partir de consumo diferencial de sustratos carbonados por suelos con maíz (a) y soja (b) en siembra directa (SD), labranza vertical (LV) y labranza convencional (LC) en los tres momentos de secuencia agronómica:

a) Maíz:

Labranza	Pre-cosecha	Post-cosecha	Barbecho
SD	0,50 ± 0,20 <i>a</i>	0,35 ± 0,06 <i>a</i>	0,16 ± 0,12 <i>a</i>
LV	0,35 ± 0,22 <i>b</i>	0,37 ± 0,07 <i>a</i>	0,18 ± 0,08 <i>a</i>
LC	0,38 ± 0,14 <i>b</i>	0,34 ± 0,04 <i>a</i>	0,23 ± 0,09 <i>a</i>

b) Soja:

Labranza	Pre-cosecha	Post-cosecha	Barbecho
SD	0,48 ± 0,16 <i>a</i>	0,31 ± 0,06 <i>a</i>	0,23 ± 0,11 <i>a</i>
LV	0,37 ± 0,15 <i>b</i>	0,35 ± 0,06 <i>a</i>	0,20 ± 0,05 <i>a</i>
LC	0,55 ± 0,20 <i>a</i>	0,33 ± 0,06 <i>a</i>	0,21 ± 0,11 <i>a</i>

Los datos corresponden a las lecturas a las 72 horas del inicio de la incubación de las placas. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos de labranza a un valor de *p* crítico de 0,05 para la misma etapa de la secuencia agronómica (contrastes realizados sobre modelos lineales mixtos).

El promedio de desarrollo del color (PDC) es una medida de actividad de respuesta a todos los sustratos de cada comunidad microbiana dividida por el número de sustratos ensayados. El cálculo de PDC fue realizado con los datos de las lecturas a las 72 horas del inicio de la incubación y por separado para cada cultivo.

Considerando cada etapa agronómica, solamente en pre-cosecha se observaron diferencias en el promedio de utilización de sustratos carbonados (PDC) entre los diferentes tipos de labranza en ambos cultivos y en este caso, la LV mostró la tendencia de menor actividad (Cuadro 12). En el caso de maíz la actividad en SD fue superior que en LC y LV, mientras que en soja la menor actividad fue en LV sin que haya diferencias entre SD y LC.

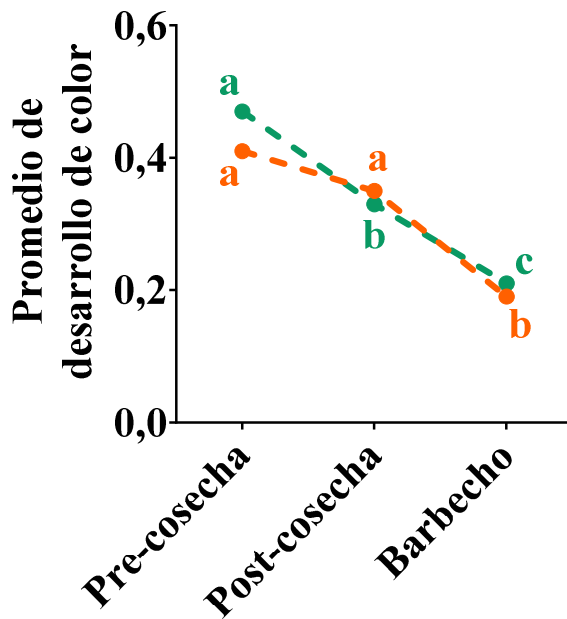


Figura 10: Evolución del PDC a partir de consumo diferencial de sustratos carbonados por las comunidades microbianas del suelo con cultivo de maíz (naranja) y soja (verde) a lo largo de la secuencia agronómica. Los datos corresponden a las lecturas a las 72 horas desde el inicio de la incubación de las microplacas. Letras distintas indican diferencias significativas entre etapas a un valor de p crítico de 0,05 para el mismo cultivo con su correspondiente color.

En cuanto a la evolución del PDC a lo largo de la secuencia agronómica, el comportamiento fue similar en ambos cultivos, observándose una disminución de actividad con tendencia lineal de pre-cosecha a barbecho (Figura 10).

3.5. Actividad microbiana del suelo

3.5.1. *Actividad hidrolítica*

La metodología HFDA permite evaluar la actividad conjunta de numerosas enzimas presentes en el suelo, tales como esterasas, lipasas y glucosidasas, entre otras. El método ha demostrado ser un buen indicador que refleja bastante la situación real de la actividad hidrolítica global de las comunidades del suelo (Green y col., 2006). Para esta evaluación se utilizaron muestras de pre- y post-cosecha. Este ensayo no se realizó para las muestras de barbecho debido a que fue agregado en años posteriores a la toma y procesamiento de dichas muestras.

En las muestras provenientes de suelos bajo maíz en ambas etapas agronómicas evaluadas se observaron diferencias en la actividad hidrolítica, asociada a una mayor producción de fluoresceína, entre los tratamientos de labranza, siendo superior la actividad en SD (Figura 11). En las muestras provenientes de suelos bajo soja en el momento de post-cosecha se observó una mayor actividad en SD, mientras en pre-cosecha los tratamientos de labranza no difirieron. El comportamiento de LV nuevamente no fue consistente, tendió a parecerse a una u otra modalidad de manejo dependiendo de cada situación. En cuanto a la dinámica de la actividad a lo largo de las etapas de la secuencia agronómica, tanto para maíz como para soja la mayor actividad se observó en post-cosecha (Figura 11). Este incremento fue mayor en lotes con maíz,

duplicándose la producción de fluoresceína de pre- a post-cosecha, mientras en lotes con soja el incremento fue de 55%.

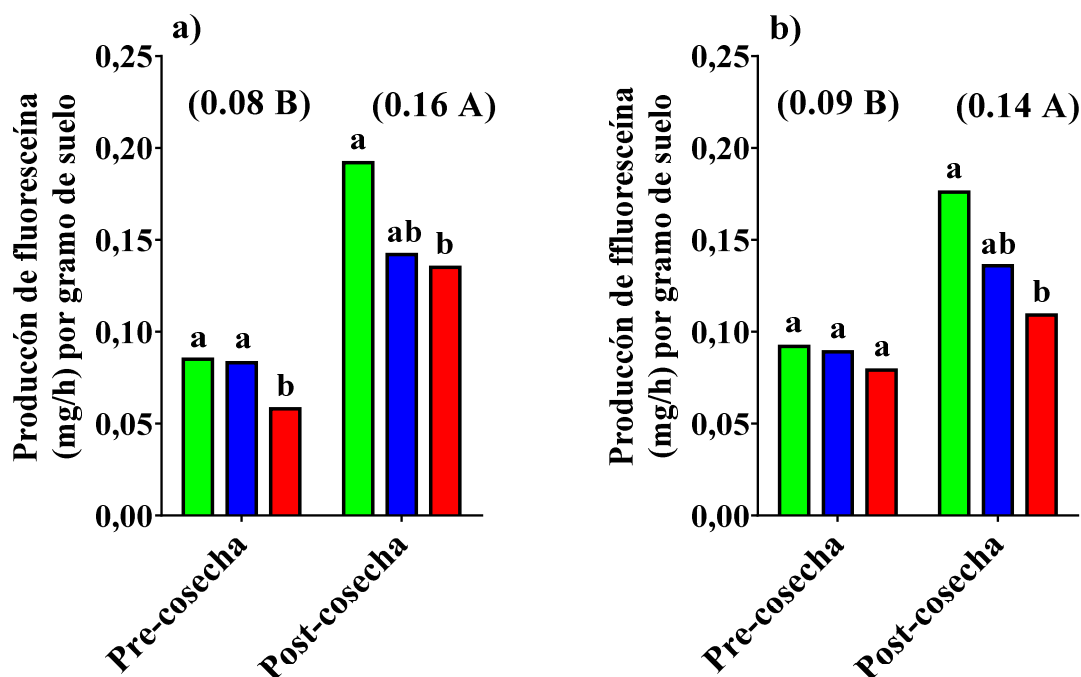


Figura 11: Actividad de hidrólisis enzimática de las comunidades microbianas estimada por hidrólisis de diacetato de fluoresceína. Las determinaciones se realizaron en dos momentos de la secuencia agronómica (pre-cosecha y post-cosecha) en suelos cultivados con maíz (a) y soja (b) en siembra directa (verde), labranza vertical (azul) y labranza convencional (rojo). Los valores entre paréntesis sobre las columnas corresponden a los promedios para cada etapa. Letras distintas indican diferencias significativas entre etapas (mayúsculas) o entre tratamientos (minúsculas) a un valor de p crítico de 0,05.

3.5.2. *Descomposición de rastrojo*

La metodología de la descomposición de rastrojo también es una medida de actividad y refleja el potencial saprofítico de las comunidades del suelo. El ensayo de descomposición de rastrojo se realizó con muestras de suelos de post-cosecha provenientes de los tratamientos de labranza más contrastantes, SD y LC. El rastrojo empleado correspondió al del cultivo antecesor de cada suelo.

En la figura 12 se muestran los porcentajes de rastrojo degradado a los 140 días de iniciada la incubación. El único factor considerado en estos ensayos fue el tipo de labranza. Observamos una mayor degradación del rastrojo de maíz en el suelo con SD, donde se degradó alrededor de 75% del rastrojo enterrado, mientras que en LC la degradación fue, aproximadamente, del 40%. Para el rastrojo de soja no se detectaron

diferencias significativas entre tipos de labranza. La actividad de las comunidades microbianas de LC (70% de rastrojo degradado) fue casi tan elevada como la de las comunidades de SD (75% degradado).

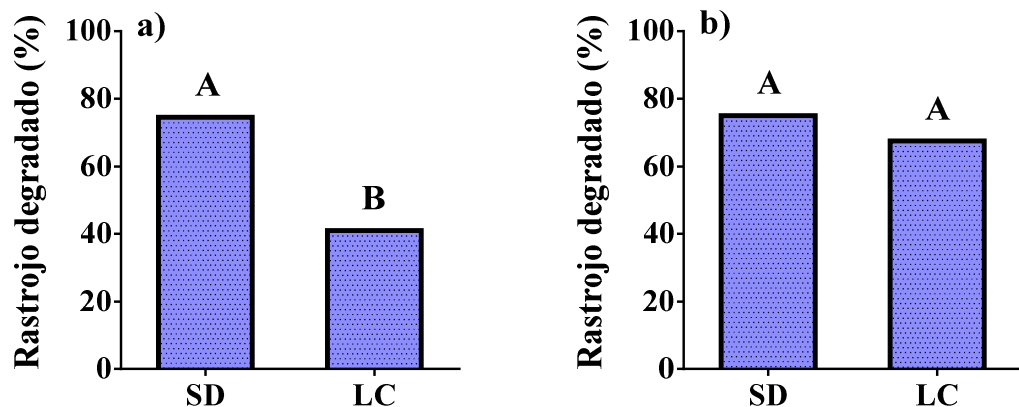


Figura 12: Porcentaje de rastrojo de maíz (a) y de soja (b) degradado a los 140 días de incubación en suelos de post-cosecha bajo siembra directa (SD) y labranza convencional (LC). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos de labranza a un valor de p crítico de 0,05.

3.6. Genes funcionales de desnitrificación

3.6.1. Estructura de genes que codifican la enzima nitrato reductasa (*nirK* y *nirS*)

Se evaluaron dos genes (*nirK*, *nirS*) involucrados en el proceso de desnitrificación a fin de evaluar la estructura funcional de las comunidades microbianas con respecto a este proceso. Ambos genes codifican dos variantes de la enzima nitrato reductasa que habrían surgido como resultado de un proceso de evolución paralela en dos grupos bacterianos diferentes. La enzima codificada por el gen *nirK* utiliza cobre como co-factor de la reacción, mientras el co-factor de la enzima codificada por *nirS* es el citocromo *cd1*. La determinación del número de copias se realizó empleando la metodología de PCR cuantitativa con cebadores específicos para cada gen. Los datos del número de copias fueron normalizados por el número de copias del gen taxonómico de bacterias (16S ARNr). Además, se calculó la relación entre ambos genes como indicador de cambios en la composición de ambos grupos bacterianos funcionales.

Se observaron diferencias en el número de copias de *nirK* (Cuadro 13) entre los tratamientos de labranza en post-cosecha y en barbecho con soja como cultivo antecesor. En ambos casos las diferencias fueron a favor de SD, siendo las diferencias más marcadas entre SD y LC. Para *nirS* se observaron diferencias en el número de copias entre los tratamientos de labranza en las tres etapas de la secuencia agronómica y

en ambos cultivos. En todos los casos hubo mayor número de copias del gen *nirS* en LC que en SD, mientras en LV tendió a parecerse a SD o LC dependiendo del caso.

La relación *nirS/nirK* (Cuadro 13) varió con los tratamientos de labranza en las etapas de post-cosecha y barbecho en ambos cultivos. Nuevamente, las diferencias mayores se manifestaron entre SD y LC, siendo la relación *nirS/nirK* más alta en LC que en SD. En este caso el comportamiento en LV tampoco resultó consistente, tendiendo a parecerse a SD o LC.

La evolución de los recuentos relativos del número de copias de *nirK* y *nirS* por cantidad del gen 16S ARNr se muestra en la figura 13. Para el gen *nirK* se observó un mayor número de copias en barbecho con cultivo de soja, mientras en maíz se detectó una disminución a lo largo de las tres etapas, aunque estas diferencias no fueron significativas. Por el contrario, no se observaron diferencias en el número de copias de *nirS* ni en la relación *nirS/nirK*, pero se observó una tendencia a la disminución de esta relación en barbecho.

Cuadro 13: Número de copias de los genes *nirK* y *nirS* normalizado por el número de copias del 16S ARNr bacteriano y la relación *nirS/nirK* en suelos con maíz (a) y soja (b) manejados con siembra directa (SD), labranza vertical (LV) y labranza convencional (LC):

a) Maíz:

Parámetro	Labranza	Pre-cosecha		Post-cosecha		Barbecho	
<i>nirK</i> /16S	SD	0,0029 ±	0,0011 <i>a</i>	0,0021 ±	0,0013 <i>a</i>	0,0023 ±	0,0006 <i>a</i>
	LV	0,0027 ±	0,0015 <i>a</i>	0,0021 ±	0,0020 <i>a</i>	0,0018 ±	0,0006 <i>a</i>
	LC	0,0029 ±	0,0013 <i>a</i>	0,0017 ±	0,0016 <i>a</i>	0,0012 ±	0,0003 <i>a</i>
<i>nirS</i> /16S	SD	0,0004 ±	0,0001 <i>b</i>	0,0003 ±	0,0001 <i>b</i>	0,0002 ±	0,0001 <i>b</i>
	LV	0,0006 ±	0,0000 <i>b</i>	0,0007 ±	0,0002 <i>ab</i>	0,0003 ±	0,0002 <i>b</i>
	LC	0,0020 ±	0,0001 <i>a</i>	0,0015 ±	0,0002 <i>a</i>	0,0012 ±	0,0004 <i>a</i>
<i>nirS/nirK</i>	SD	0,15 ±	0,04 <i>a</i>	0,16 ±	0,08 <i>b</i>	0,02 ±	0,01 <i>b</i>
	LV	0,15 ±	0,02 <i>a</i>	0,30 ±	0,07 <i>ab</i>	0,18 ±	0,09 <i>ab</i>
	LC	0,30 ±	0,06 <i>a</i>	0,36 ±	0,08 <i>a</i>	0,56 ±	0,09 <i>a</i>

b) Soja:

Parámetro	Labranza	Pre-cosecha		Post-cosecha		Barbecho	
<i>nirK</i> /16S	SD	0,0029 ±	0,0011 <i>a</i>	0,0030 ±	0,0019 <i>a</i>	0,0071 ±	0,0021 <i>a</i>
	LV	0,0032 ±	0,0016 <i>a</i>	0,0019 ±	0,0018 <i>ab</i>	0,0049 ±	0,0020 <i>b</i>
	LC	0,0021 ±	0,0013 <i>a</i>	0,0015 ±	0,0008 <i>b</i>	0,0028 ±	0,0027 <i>b</i>
<i>nirS</i> /16S	SD	0,0003 ±	0,0002 <i>b</i>	0,0004 ±	0,0002 <i>b</i>	0,0003 ±	0,0002 <i>b</i>
	LV	0,0006 ±	0,0003 <i>b</i>	0,0007 ±	0,0002 <i>ab</i>	0,0007 ±	0,0003 <i>a</i>
	LC	0,0029 ±	0,0008 <i>a</i>	0,0012 ±	0,0008 <i>a</i>	0,0008 ±	0,0002 <i>a</i>
<i>nirS/nirK</i>	SD	0,15 ±	0,01 <i>a</i>	0,25 ±	0,09 <i>b</i>	0,04 ±	0,02 <i>b</i>
	LV	0,21 ±	0,09 <i>a</i>	0,37 ±	0,09 <i>b</i>	0,12 ±	0,04 <i>ab</i>
	LC	0,27 ±	0,06 <i>a</i>	0,91 ±	0,11 <i>a</i>	0,46 ±	0,06 <i>a</i>

Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos de labranza un valor *p* crítico de 0,05 en cada etapa (contrastes realizados sobre modelos lineales mixtos).

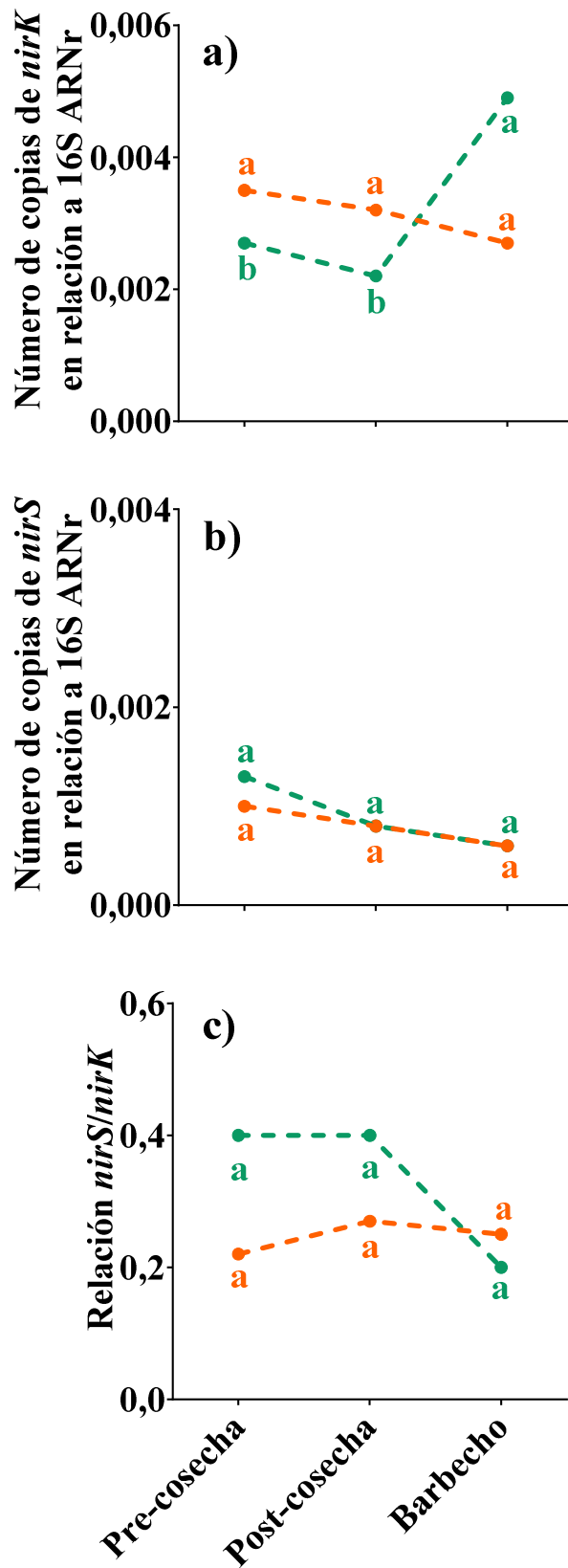


Figura 13: Evolución del número de copias de los genes *nirK* (a) y *nirS* (b) normalizado por el número de copias del 16S ARNr bacteriano y la relación *nirS/nirK* (c) a lo largo de la secuencia agronómica en maíz (naranja) y soja (verde). Para cada etapa se agruparon los datos de los tratamientos. Letras distintas indican diferencias significativas entre las etapas a un valor p crítico de 0,05 (contrastes realizados sobre modelos lineales mixtos).

3.6.2. Modelos de predicción para los genes *nirK* y *nirS*

Cuadro 14: Modelos lineales de predicción para el número de copias de genes funcionales *nirK* y *nirS*:

Modelo 1:

$$\text{Nº de copias } nirK/16S = 0,0080 + (MO*0,0015) + (Arcilla*0,0004)$$

Modelo 2:

$$\text{Nº de copias } nirS/16S = 0,0854 - (C/N*0,0076) - (Arcilla*0,0055) + (Limo*0,0002)$$

Se diseñaron modelos de predicción de los parámetros microbiológicos con las variables de fertilidad del suelo. De los parámetros de estructura y actividad microbiana evaluados los que mejor respuesta mostraron a estas variables fueron los números de copias de los genes *nirK* y *nirS*. Los modelos para estos genes se diseñaron para la etapa de post-cosecha en la cual contábamos con la mayor cantidad de datos de las características del suelo.

La respuesta del número de copias del gen *nirK* se observó en el cultivo de soja (Cuadro 14, Modelo 1) y del gen *nirS* en el cultivo de maíz (Cuadro 14, Modelo 2), mientras la relación *nirS/nirK* no mostró respuestas a los parámetros físico-químicos del suelo que fueron probados a un valor *p* crítico de 0,05. El gen *nirK* respondió positivamente al contenido de materia orgánica ($p=0,008$) y al porcentaje de arcilla ($p=0,007$), ($R^2 = 0,54$) en el cultivo de soja. Mientras en gen *nirS* respondió negativamente a la relación C/N ($p=0,003$) y los contenidos de arcilla ($p=0,004$) y de manera positiva a los contenidos de limo ($p=0,004$), ($R^2 = 0,063$).

Capítulo 4

DISCUSIÓN

4.1. Los manejos agronómicos afectan los parámetros físico-químicos del suelo en experimentos de larga duración

El objetivo principal de esta tesis fue evaluar el efecto de diferentes tipos de manejos sobre la diversidad y funcionamiento de las comunidades microbianas a lo largo del ciclo agronómico, ya que es bien sabido que los manejos pueden provocar cambios las características físico-químicas del suelo y éstas, a su vez, tienen un gran impacto sobre la microbiota edáfica. Es por este motivo que discutiremos en primer lugar los cambios observados en algunos parámetros relacionados con la estructura y la fertilidad ocurridos en los suelos del experimento de larga duración en el que se basó este trabajo. De los factores de fertilidad del suelo que se evaluaron en este trabajo detectamos diferencias debidas a los tratamientos en los contenidos de partículas finas (arcilla y limo) asociados a los diferentes tipos de labranza y en el contenido de fósforo y pH debidos a los tratamientos de fertilización.

En primer lugar, las diferencias observadas en los contenidos de partículas finas a pesar de ser pequeñas resultaron estadísticamente significativas. Estos contenidos de partículas finas no respondieron de la misma manera a los manejos de labranza. Mientras el contenido de arcilla fue mayor en SD que en LC y LV, el contenido de limo fue mayor en SD y en LC y el menor en LV. Los resultados en los contenidos de arcilla son esperables ya que es común detectar pérdida de estas partículas en suelos bajo LC. La principal causa de pérdidas de arcilla en ambientes planos es la erosión eólica en suelos sin cobertura después de un laboreo con reja y vertedera. La susceptibilidad a pérdida de arcilla en las capas superiores de suelos laboreados está bien establecida (Álvarez y col., 1995; Galantini e Iglesias, 2007). Por ejemplo, Alvares y colaboradores (1995) sostienen que hasta 5 cm del perfil del suelo puede perderse por erosión en un siglo de uso agrícola intensivo. Si bien en la zona donde se ubica EEA Gral. Villegas el impacto eólico no es tan importante como en el sur de la Región Pampeana, donde los vientos se destacan por su fuerza (Schmidt y Amiotti, 2015), nuestros resultados muestran pérdida de arcilla en esta región. Las diferencias sutiles observadas podrían ser las primeras señales de un cambio textural futuro. A pesar de la elevada estabilidad de las características texturales y el requerimiento de un lapso de tiempo considerable para que las pérdidas de arcilla se tornen importantes, en nuestro caso, los 22 años de los diferentes manejos fueron suficientes para que se manifieste la disminución de partículas finas en suelos con laboreo.

Es más complejo explicar los menores contenidos de limo y arcilla en suelos con LV. Sin embargo, se podría especular que una posible causa podría ser el descenso de partículas finas a mayor profundidad debido a las aperturas en el perfil del suelo y las vibraciones propias de los cinces. Teniendo en cuenta que tanto en SD como en LV los restos de cosecha permanecen en superficie, protegiendo las partículas finas de los efectos del viento, la presencia de estas aperturas y las vibraciones del implemento podría ser la mayor diferencia entre LV y LC, las cuales explicarían las diferencias observadas a nivel de contenidos de arcilla y limo. Este descenso de partículas a mayor profundidad puede ser una buena explicación de por qué los contenidos de limo son menores que en LV, si estas partículas no están expuestas al viento como en LC cuyo contenido de limo no difirió de SD. El hecho de que la fuerza del viento no sea

suficiente para trasladar las partículas de limo explica la ausencia de diferencias en el contenido de limo entre suelos expuestos bajo LC y los no laboreados y cubiertos bajo SD. La pérdida de arcillas se da por dos mecanismos diferentes en LC y LV, mientras en la primera las partículas livianas son llevadas por los vientos, en LV éstas descienden por las aperturas del suelo, potenciándose este descenso por las vibraciones de los cinceles. Un muestreo estratificado y hasta una mayor profundidad permitiría poner a prueba esta presunción.

En segundo lugar, observamos diferencias en el pH, un parámetro químico del suelo cuyo efecto sobre las comunidades microbianas está ampliamente documentado (Cuhel y col., 2010, Bodelier, 2011, Kuramae y col., 2011, Schneider y col., 2012, Navarro-Noya y col., 2013, Carbonetto y col., 2014). En nuestro caso los valores de pH resultaron todos cercanos a 6 y presentaron una importante uniformidad entre lotes, con coeficientes de variación no superiores al 4%. Esta uniformidad nos permitió observar las pequeñas diferencias en pH entre los suelos de los tratamientos sin y con fertilización fosforada, siendo levemente superiores en estos últimos (Cuadro 3 en resultados). La magnitud de esta diferencia es poca tanto desde el punto de vista agronómico como del microbiológico. Álvarez (2001) argumenta que la fertilización fosforada aún no produjo importantes efectos sobre el pH de los suelos de la Región Pampeana, debido a su relativamente corta historia de uso agrícola, entre unos 60 y 130 años. El aumento del pH que observamos en los lotes con aplicación de fosfato monoamónico podría deberse al efecto inmediato de alcalinización que produce dicho fertilizante (Campillo y Sadzawka, 2006). Sin embargo, desde la aplicación del fertilizante a la siembra y hasta el mes en el que se realizó el muestreo pasó tiempo suficiente como para atribuir estas diferencias al efecto de alcalinización inmediata, o bien, podemos suponer que el pH se encuentra en la etapa de estabilización. Otro aspecto interesante a destacar es que el efecto del fertilizante no parece ser dependiente del cultivo ya que las diferencias fueron detectadas en los bloques 4, 5 y 6 en los cuales en el año de muestreo en post-cosecha el cultivo antecesor fue maíz y en el año del muestreo en pre-cosecha el cultivo fue soja.

Otros parámetros químicos del suelo capaces de afectar a las comunidades microbianas son los contenidos de fósforo extractable y de nitrógeno total. Si bien, el impacto del contenido de fósforo en la microbiota del suelo está bien documentado (Bodelier, 2011; Carbonetto y col., 2014) éste parece ser bastante variable (Bünemann y col., 2011; Massey y col., 2016). Por ejemplo, mayores contenidos de fósforo pueden derivar en mayor biomasa microbiana (Liu y col., 2012), asociarse a diferencias en la composición de las comunidades (Carbonetto y col., 2014), a mayor presencia de hongos (Ng y col., 2012) o de nitrificadores (Hayden y col., 2010) o no mostrar efectos de este nutriente (Massey y col., 2016). Carbonetto y colaboradores (2014) observaron estrecha interacción entre la respuesta de las comunidades microbianas a los contenidos de fósforo con otros factores como el tiempo, el tratamiento y el sitio. En otras palabras, la respuesta a los efectos de fósforo podría deberse a la interacción con los demás parámetros del suelo o con la existencia de otras limitaciones que impedirían la respuesta a mayores contenidos de este nutriente. Esto podría haber ocurrido en nuestro caso, ya que los contenidos elevados de fósforo en los lotes fertilizados no se reflejaron en ninguna de las características de las comunidades microbianas evaluadas en este trabajo. Como ejemplo de resultados recientes parecidos a los nuestros, Massey y colaboradores (2016) también reportaron ausencia de efectos detectables de la fertilización fosforada sobre las comunidades microbianas, atribuyendo estas ausencias

a limitaciones en carbono. Es sabido que el carbono es el principal nutriente que limita el crecimiento microbiano (Bünemann y col., 2011).

El nitrógeno es también un componente del fosfato mono-amónico que se aplica en el contexto experimental de EAA Gral. Villegas. Este fertilizante contiene 25 kg fósforo soluble y 11 kg de nitrógeno amoniacal por cada 100 kg aplicados (Álvarez y Mulin, 2004). Era de esperar que se manifesten estos efectos de nitrógeno extra en los lotes fertilizados tanto en los parámetros químicos como microbiológicos del suelo. Dada la importancia de este nutriente, sus efectos sobre los microorganismos del suelo han recibido considerable atención (Kowalchuk y Stephen, 2001; Cavangaro y col., 2008; Coelho y col., 2009; Hallin y col., 2009; Chen y col., 2010; Hayden y col., 2010; Fierer y col., 2012). Por ejemplo, los efectos de la fertilización nitrogenada no solo se pueden observar a nivel de características más globales de las comunidades microbianas, como la composición de la misma (Fierer y col., 2012), la disminución de la abundancia de bacterias (Hallin y col., 2009) o una mayor diversidad catabólica (Fierer y col., 2012), sino también afectando a determinados grupos funcionales. Por ejemplo, Hallin y colaboradores (2009) reportan disminución de poblaciones de desnitrificadores (genes *nirK*, *nirS*, *nosZ* y *narG*) y nitrificadores (genes *amoA*) en lotes fertilizados con sulfato de amonio. Mientras Chen y colaboradores (2010) reportan diferente sensibilidad de un grupo particular de desnitrificadores funcionalmente redundantes, donde un tipo de ellos aumentó con la fertilización (*nirS*), mientras el otro no varió (*nirK*). Si bien, los aportes extra de nitrógeno amoniacal, que constituye un 11% del fertilizante, no necesariamente deben ser reflejados en los niveles de nitrógeno total, esperábamos observar efectos de estos aportes sobre las comunidades desnitrificadoras, presunción que no se cumplió.

Sorprendentemente, los contenidos de materia orgánica (MO) y como se mencionó antes, de nitrógeno total (N_{tot}) y la relación entre carbono y nitrógeno (C/N) no fueron afectados por los tratamientos de labranza ni de fertilización. Posiblemente, la dificultad para el secuestro de carbono resida en las características texturales de estos suelos, la cual se agudiza por las condiciones climáticas sub-húmedas que no favorecen la actividad microbiana y la producción de suficiente biomasa por los cultivos. La mejora en la captura de humedad bajo SD y el mayor tiempo de permanencia de los residuos de cosecha estimulan el secuestro de carbono en el suelo, y por lo tanto esperaríamos un mayor contenido de C en los suelos bajo SD y también bajo LV. El bajo secuestro de carbono observado en los suelos de este estudio posiblemente se deba al elevado contenido de arena, la baja fertilidad de los suelos y las escasas precipitaciones, lo cual sumado limita la producción de biomasa vegetal y por ende, la actividad microbiana. Incluso existen antecedentes de efectos negativos de la adopción de la SD en suelos de zonas con limitaciones climáticas, ya que este paquete tecnológico fue desarrollado para zonas de la Pampa Húmeda en las cuales su implementación resulta exitosa (Amiotti y col., 2012; Schmidt y Amiotti, 2015). Dadas las limitaciones climáticas de la zona donde se ubica EAA Gral. Villegas y el elevado contenido de arena en suelos del campo experimental es razonable no observar mayores contenidos de carbono luego de 22 años de manejo continuo bajo SD. Eventualmente, en nuestro caso se requiera un mayor lapso de tiempo para visualizar los incrementos en los contenidos de materia orgánica en suelos bajo SD y dichos incrementos posiblemente serán consecuencia de un mayor contenido de arcilla del cual ya detectamos las primeras señales.

4.2. Los rendimientos de los cultivos responden a la fertilización y mostraron una marcada dependencia climática

Otro factor de importancia para ubicar los resultados de este trabajo en contexto es el análisis de los datos de rendimiento de los cultivos durante el periodo cubierto por esta tesis. Los rendimientos respondieron a la fertilización, pero esta respuesta dependió en gran medida de las precipitaciones. En la campaña 2010/11 las condiciones climáticas durante el ciclo del cultivo fueron típicas para esta zona, con alrededor de 600 mm de precipitación anual distribuidas entre primavera, verano y otoño y sin excesos. Los volúmenes de producción de alrededor de 11 T/ha de maíz y 4 T/ha de soja también fueron típicos para la zona y pueden ser tomados como referencia, o línea de base, para las condiciones del experimento. Aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas en esta campaña hubo rendimientos 8% mayores en los suelos fertilizados. La campaña 2011/12 fue muy lluviosa y se produjeron mermas en el rendimiento de gran magnitud en el cultivo de maíz causadas por una mayor incidencia de enfermedades, con cosechas que fueron 60% menores que la línea de base. En esta misma campaña el impacto negativo sobre los rendimientos de soja fue de una magnitud mucho menor. Al inicio de la campaña siguiente, 2012/13, el exceso de lluvia causó una pérdida de los cultivos sembrados y se debió realizar una consecuente re-siembra que se tradujo en una duración del ciclo más corta. Este atraso en la fecha de siembra causó una caída importante en los rendimientos, pero de menor magnitud que lo ocurrido en la campaña anterior. La aplicación del fertilizante fosfato mono-amónico permitió disminuir las pérdidas de rendimientos de maíz en la campaña de 2012/13, en la cual la siembra fue atrasada. En la misma campaña la fertilización no tuvo efectos sobre los rendimientos de soja, mientras que el exceso de lluvias durante el ciclo productivo en la campaña anterior (2011/12), impactó de manera diferencial los rendimientos de los cultivos en estudio. La fertilización tuvo efectos positivos en el rendimiento de soja, mientras que en el de maíz el efecto fue negativo. El rendimiento de un cultivo es una variable compleja y es el resultado de la interacción de un conjunto de factores, entre los cuales figura la modalidad de laboreo que no es necesariamente el más importante. Los rendimientos pueden ser mayores en suelos laboreados que bajo SD (Álvarez y Steinbach, 2009; Pittelkow y col., 2015; Zuber y Villamil, 2016). Álvarez y Steinbach (2009) informaron que los rendimientos en general no son afectados por el tipo de labranza en climas húmedos y sin limitaciones de nitrógeno. Si bien la SD tiende a mejorar la retención hídrica, esto va a depender en gran medida de la textura del suelo y de los volúmenes de precipitaciones y su distribución en el año.

El hecho de que los rendimientos de los cultivos no se distingan entre los tratamientos de labranza tanto en años de muestreo como en los anteriores al presente trabajo (Díaz-Zorita y Basanta, 1999; Barraco y col., 2004; Díaz-Zorita y col., 2004; Alvarez y col., 2006; Barraco y col., 2006) puede ayudar en entender la falta de diferencias en los contenidos de materia orgánica en estos suelos. Dado que los restos vegetales de los cultivos son la principal vía de ingreso del carbono al suelo, la ausencia de diferencias en los rendimientos determina los mismos aportes de biomasa vegetal en lotes con diferente modalidad de laboreo.

4.3. La estructura de la comunidad bacteriana se modifica con el tipo de laboreo y el momento del ciclo agronómico

Observamos efectos de los tratamientos de labranza sobre la estructura y diversidad de las comunidades de bacterias. La estructura, definida por el patrón de bandas en los geles de DGGE fue marcadamente diferente entre las comunidades de suelos bajo SD y LC. Con respecto a los suelos bajo LV, dependiendo del lote, las comunidades microbianas presentaron patrones que fueron más similares a los de SD o LC. La labranza vertical presenta características que la asemejan a uno u otro tipo de laboreo, por un lado la presencia de cobertura sobre el suelo como en SD y por otro, cierta heterogeneidad espacial debida a la alternancia de suelo removido por la pasada de los cinceles con sitios no laboreados entre los cinceles. Esta alternancia podría generar micro-sitios con condiciones más parecidas a las presentes en los suelos bajo LC en las líneas de laboreo o bajo SD entre líneas de laboreo, y puede ser la causa de que las comunidades microbianas de suelos con LV en vez de tomar una posición intermedia se parezcan a las de SD o a los de LC dependiendo del sitio en el que fue tomada cada muestra.

Aunque las diferencias más pronunciadas a nivel estructural se dieron entre SD y LC, es importante recalcar que la magnitud de estas diferencias fue mayor o menor dependiendo de cada bloque. Estas diferencias pueden deberse a la variabilidad propia de los sistemas biológicos, pero también pueden intervenir otros factores no analizados en este trabajo. Por ejemplo, Kuramae y colaboradores (2011) sugieren un mayor efecto de la cobertura del suelo que del uso que se le dé al mismo, como determinantes de la estructura de las comunidades de bacterias. Estos y otros autores informaron la importancia de la relación C/N y del pH (Kuramae y col., 2011; Ng y col., 2012), pero también se han indicado otros factores potencialmente importantes, como los contenidos de nitrógeno (Ng y col., 2012; Carbonetto y col., 2014), carbono (Ng y col., 2012; Navarro-Noya y col., 2013) y la composición textural del suelo (Kuramae y col., 2011). En nuestro estudio no observamos diferencias importantes de pH, relación C/N, ni contenidos de C y N entre tratamientos evaluados. De este modo, para los factores citados, nuestros resultados apoyan la hipótesis del efecto de la composición textural del suelo. Diferencias a nivel de la estructura genética bacteriana en función de los manejos son frecuentemente observadas en experimentos de corta y larga duración (Feng y col., 2003; Peixoto y col., 2006; Carbonetto y col., 2014). Simultáneamente, estos cambios parecen ser una respuesta a cada situación particular bajo estudio, ya que en numerosas ocasiones la estructura de las comunidades bacterianas no mostró variaciones entre diferentes tipos de laboreo (Spedding et al., 2004; Helgason y col., 2010; Bissett y col., 2011; Ng y col., 2012; Bissett y col., 2013). Otro aspecto a destacar es la mayor homogeneidad genética de las comunidades bacterianas provenientes de suelos con LC. Esta homogeneidad podría ser la consecuencia del “mezclado” del suelo que efectúa el sistema de laboreo con reja y vertedera, quebrando agregados e invirtiendo las capas superiores del perfil edáfico. Si bien es esperable una mayor homogeneidad microbiana en los ambientes cultivados que en aquellos sin disturbar (Carbonetto y col., 2014), dentro del contexto de ambientes agrícolas, los más homogéneos van a ser aquellos cuyas condiciones del perfil edáfico resulten más uniformes.

Con respecto a los cultivos en estudio, fue inesperado no observar los efectos de los mismos sobre la estructura de las comunidades de bacterias a pesar de que es sabido

que las comunidades microbianas pueden diferir de manera importante en suelos con especies vegetales diferentes (Smalla y col., 2001; Benging y col., 2002; Bais y col., 2006; Berg y Smalla, 2009) sea por las características de sus exudados o por la calidad de residuos vegetales. En este sentido, Navarro-Noya y colaboradores (2013) postularon una mayor importancia de la secuencia del cultivo que del tipo de labranza. Mientras que Meriles y colaboradores (2009) concluyeron que la influencia del tipo de labranza sobre las comunidades microbianas es más importante que la del cultivo. En nuestro caso, la rotación continua de los cultivos podría ser la causa de la ausencia de patrones diferenciales entre los dos cultivos. Aparentemente, el efecto de esta rotación desde hace 22 años uniformiza a las comunidades bacterianas de estos suelos y este efecto es más fuerte que el del cultivo presente o el antecesor en un año dado. Por otro lado, las comunidades bacterianas tampoco presentaron variaciones temporales importantes en su estructura genética. Esta ausencia de diferencias entre los momentos de muestreo y entre cultivos podría ser explicada por la adaptación de las comunidades bacterianas de los suelos agrícolas a las fluctuaciones temporales del entorno tales como las rotaciones de cultivos, la fertilización periódica, las aplicaciones de productos químicos y cambios en la disponibilidad de nutrientes. Nuestros resultados coinciden con observaciones registradas en suelos de la Región Pampeana por Carbonetto y colaboradores (2014). A un nivel más general, se puede concluir que no existiría un único factor o grupo de factores que condicionen el patrón estructural que adoptará una comunidad microbiana. Por el contrario, el modelado de la estructura de una comunidad microbiana dependería de la interacción de ciertos factores cuya importancia individual estará determinada a su vez por condiciones ambientales y/o temporales.

La biodiversidad, sea ésta estructural o funcional, permite predecir la estabilidad de los ambientes (Bodelier, 2011) ante perturbaciones y cambios temporales y espaciales (Mulder y col., 2001; Bodelier, 2011). Es esperable una mayor productividad y estabilidad de ambientes con mayor riqueza genotípica (Bodelier, 2011) y además en tales ambientes es esperable observar mayor diversidad funcional (Bodelier, 2011). Como estimadores de biodiversidad se utilizan índices calculados a partir de características genotípicas o fenotípicas de la comunidad. Estos índices permiten reducir una información compleja en un valor numérico simple que refleje los valores relativos de abundancia o equitatividad de la comunidad microbiana (Bent y Forney, 2008). Además, existen otros índices como el de Simpson (Simpson, 1949) que es un buen estimador de la diversidad global, y que resulta lo suficientemente robusto frente a las distorsiones que puede causar la presencia de ejemplares poco frecuentes (Bent y Forney, 2008).

En nuestro caso, de los índices derivados de los perfiles de bandas obtenidos por DGGE, la riqueza fue el que más respondió a los tratamientos de labranza, mientras que las diferencias en la diversidad de Simpson fueron bajas y la equitatividad no difirió entre los tratamientos. Sin embargo, las diferencias en riqueza parecen ser una respuesta a un conjunto de factores, además de la labranza, como el cultivo y el momento en el que fue hecha la evaluación. La sensibilidad de la riqueza puede derivar en una respuesta poco clara, como la observada por nosotros, y en este caso una interpretación más cuidadosa puede basarse en un índice de mayor robustez frente a una fracción poblacional pequeña, como el de la diversidad de Simpson (Bent y Forney, 2008). En nuestro caso se puede afirmar que los tratamientos de labranza no afectaron de manera importante a la diversidad estructural de las comunidades bacterianas, a pesar de la diferente composición de estas comunidades. Posiblemente la respuesta de la diversidad genética bacteriana sea una consecuencia del estatus nutricional de los suelos, mientras

su composición responde a los tratamientos de labranza a pesar de la ausencia de diferencias evidentes en los contenidos de carbono y nitrógeno y en los valores del pH.

Considerando las diferentes etapas del ciclo agrícola los índices de biodiversidad mostraron una clara variación temporal, observándose una menor riqueza en pre-cosecha y un aumento de la misma en barbecho. Para interpretar estos resultados es importante tener en cuenta que estamos trabajando con el ADN extraído de microorganismos activos, en estado de dormición e incluso con ADN de organismos muertos, cuyo ADN podría quedar protegido de la degradación. De esta manera, lo que observamos es reflejo del momento actual que enfrenta la comunidad microbiana. Es decir, las comunidades microbianas responden a las diferencias en los aportes en calidad y cantidad de carbono de cada etapa. Mientras en pre-cosecha el principal aporte en el suelo van a ser los exudados radicales, en post-cosecha y barbecho estos aportes van a ser dominados por los restos vegetales de gran volumen y una mayor recalcitrancia vegetales. Además, la calidad de los restos de ambos cultivos va a ser diferente, siendo más elevada la relación C/N y el volumen en los restos de maíz que en los de soja (Johnson y col., 2007), así como las diferentes calidades de exudados radicales de cada uno de estos (Bais y col., 2006) en pre-cosecha y en parte en post-cosecha. En paralelo, la reducción de la equitatividad de las comunidades bacterianas hacia barbecho, sugiere la aparición de grupos bacterianos dominantes. Este resultado fue más marcado en suelos con cultivo de maíz que con soja, pudiendo ser atribuido nuevamente a que los contenidos de carbono en el rastrojo de maíz son más elevados. Este análisis aporta conocimiento sobre la diversidad estructural de las bacterias, pero no nos permite saber cuáles son los grupos taxonómicos dominantes en cada etapa del ciclo agrícola analizada. Para responder esta pregunta se podría complementar el análisis con una extracción del ADN de bandas individuales para su secuenciación y consecuente determinación de su identidad taxonómica. Por otro lado, una interesante estrategia para continuar con este estudio podría ser el análisis de las comunidades microbianas empleando las nuevas técnicas de secuenciación masiva de ADN que permiten obtener un relevamiento mucho más detallado de su composición.

Para estimar las abundancias de las comunidades bacterianas en los diferentes tratamientos a lo largo de la secuencia agronómica utilizamos una técnica de biología molecular que permite cuantificar el número de copias del gen que codifica para el RNA ribosomal de 16S (16S rRNA). Mediante esta técnica pudimos determinar que la cantidad total de bacterias disminuye a lo largo de la secuencia agronómica, siendo el barbecho la etapa en la cual se obtuvo el menor número de ellas. Este resultado fue algo esperable ya que esta etapa, bajo condiciones climáticas más frías y más secas, resulta menos favorable para los microorganismos del suelo. En contraste, esperábamos números más altos en post-cosecha debido a la mayor disponibilidad de los compuestos carbonados presentes en los restos vegetales. Sin embargo, los resultados obtenidos mostraron una disminución de abundancia de bacterias hacia post-cosecha. La razón de que las bacterias disminuyan en post-cosecha podría atribuirse a la calidad de los residuos vegetales de esta etapa, siendo estos más complejos que los aportes de pre-cosecha que son principalmente los exudados radicales. Se sabe que los hogos del suelo son los principales actores en la descomposición del material vegetal muerto (Schneider y col., 2012) y las bacterias podrían ser desplazados por este grupo microbiano cuyo estudio no fue un objetivo de este trabajo. Esta hipótesis podría ponerse a prueba utilizando al gen marcador taxonómico de hongos (18S rRNA) y siguiendo la variación temporal de las poblaciones fúngicas. La mayor abundancia de bacterias observada en pre-cosecha puede deberse a varias causas, entre ellas a la presencia de las plantas vivas

que, a través de sus exudados, promueve un mayor tamaño de la población bacteriana por el aporte de fuentes de carbono lábiles y material fresco muerto en forma de raíces y hojas. Por otra parte, en este trabajo, ni los tratamientos de labranza ni los de fertilización parecieron tener efecto sobre la abundancia de las bacterias. La ausencia de diferencias entre los tratamientos de labranza puede atribuirse a que estos tratamientos no tuvieron impacto en el contenido de carbono y nitrógeno del suelo. Sin embargo, existen trabajos en los que la abundancia de bacterias tampoco difirió entre SD y LC (Ng y col., 2012), a pesar de haber diferencias en los contenidos de carbono del suelo (Navarro-Noya y col., 2013). Más sorprendente aún fue no observar diferencias en los lotes con contenidos de fósforo marcadamente superiores, aquellos que reciben fosfato mono-amónico durante los últimos 12 años. En este caso, una posible causa puede ser la limitación en carbono fácilmente asimilable o en algún otro nutriente que impide que el fertilizante sea aprovechado por los microorganismos y que éstos puedan expresar todo su potencial (Bünemann y col., 2011; Massey y col., 2015).

4.4. El momento del ciclo agronómico, pero no el laboreo, modifica la diversidad funcional microbiana medida por el consumo de sustratos carbonados

Para una interpretación desde el punto de vista funcional evaluamos las respuestas de las comunidades microbianas frente al consumo de una gama de diferentes sustratos carbonados. Este ensayo permite evaluar aspectos fenotípicos-fisiológicos de las comunidades microbianas, estudiando por un lado los perfiles catabólicos de las mismas, así como calculando índices que permiten obtener datos de biodiversidad funcional y actividad.

La mayor heterogeneidad observada en los perfiles de utilización de sustratos carbonados en pre-cosecha, así como la mayor actividad medida como el desarrollo de color derivado del consumo de los mismos, podría deberse a la presencia de plantas vivas que afectan a las comunidades microbianas, principalmente por un efecto mecánico causado por las raíces y otro químico, por sus exudados (Bais y col., 2006). Si bien, la influencia de las raíces va a ser más fuerte en la línea de siembra, su efecto podría ser importante hasta en los entre-surcos, donde fueron tomadas las muestras, y en mayor medida en el momento de pre-cosecha cuando el crecimiento radical está más extendido. Por otro lado, los microorganismos heterótrofos de rápido crecimiento evaluados por este método son capaces de aprovechar fuentes de carbono lábiles, como los presentes en los exudados radicales y por otro, los compuestos utilizados en nuestro ensayo son los presentes en los exudados radicales (Campbell y col., 1997). Por estos motivos, es razonable que las comunidades de pre-cosecha respondan de manera más activa a los sustratos utilizados que las de otras etapas del ciclo agronómico. La superposición de los perfiles catabólicos de las comunidades microbianas en post-cosecha y barbecho en los suelos cultivados con soja tendió a ser mayor que la observada en los suelos con maíz, posiblemente a causa de las diferencias en la calidad del rastrojo de ambos cultivos (Johnson y col., 2007). En apoyo al efecto de la vegetación sobre la caracterización fisiológica de las comunidades microbianas

Grayston y colaboradores (2004) informaron que la presencia de arbustos y juncos en un pastizal puede modificar los perfiles catabólicos de las comunidades.

Una observación que se puede realizar sobre la metodología empleada en este estudio es el bajo número de sustratos carbonados incluidos en el ensayo, sobre todo en el ensayo conjunto de los tres momentos de la secuencia agronómica, donde se utilizaron 10 sustratos carbonados. Sin embargo, Campbell y colaboradores (1997) al evaluar el poder discriminatorio de 125 sustratos, en nueve sitios diferentes, concluyen que con una cuidadosa selección de algunos pocos de ellos, principalmente los representativos de los exudados radicales, es suficiente para diferenciar los ambientes. Una ventaja adicional de usar pocos sustratos cuidadosamente seleccionados es evitar la redundancia de los mismos, lo cual resulta una mayor eficiencia en la aplicación de esta metodología (Campbell y col., 1997; Preston-Mafham y col., 2002). En nuestro caso, observamos diferencias en los perfiles catabólicos en la secuencia temporal pero no entre sistemas de labranza, resultados que son coincidentes con los reportados por Bissett y colaboradores (2013), quienes tampoco observaron diferencias entre tratamientos de labranza pero sí una variación importante según los distintos momentos del año. Otros autores trabajando con suelos de este mismo experimento y utilizando las placas EcoPlate (BiologTM) que contienen 31 sustratos carbonados diferentes, tampoco observaron patrones que permitieran diferenciar catabólicamente las comunidades microbianas bajo estudio (Fernandez-Canigia y Diaz-Zorita, 1999). Si bien, al momento del estudio realizado por ellos habían transcurrido pocos años desde el inicio del experimento, aparentemente luego de 22 años las comunidades microbianas tampoco manifiestan diferencias a nivel metabólico. La causa de la ausencia de diferencias en los perfiles catabólicos y en la abundancia bacteriana podría deberse a que los suelos mostraron valores de nutrientes similares. Efectivamente, Grayston y colaboradores (2004) informaron elevados niveles de correlación entre los perfiles de consumo de sustratos carbonados por las comunidades microbianas y los contenidos de materia orgánica y pH. En nuestro caso, no observamos diferencias en contenidos de carbono y nitrógeno, ni en los valores de pH y por ende, sería razonable no haber hallado diferencias en los perfiles catabólicos de comunidades microbianas.

Como se mencionó anteriormente a partir de los experimentos de consumo de sustratos carbonados en microplacas también es posible obtener un estimador de la actividad calculado como el promedio del desarrollo de color (PDC) para cada tratamiento. Asimismo, a partir de los perfiles de consumo de los sustratos, de la misma manera que con los perfiles de bandas de DGGE, se calculan índices de diversidad metabólica de las comunidades microbianas. Estos estimadores de la biodiversidad respondieron de manera similar a lo observado cuando se analizaron los perfiles catabólicos, las comunidades de pre-cosecha fueron las que mostraron una mayor sensibilidad a los sustratos. Tanto la actividad como la riqueza y la diversidad en pre-cosecha fueron más altas y los valores más bajos se obtuvieron en barbecho, etapa en la cual la actividad microbiana se encuentra limitada por razones climáticas y con muchos microorganismos en estado inactivo. Los motivos de esta temporalidad en la respuesta posiblemente sean los mismos que los discutidos anteriormente, siendo el de mayor peso los sustratos utilizados, los cuales simulan las fuentes de carbono presentes en los exudados radicales.

4.5. El laboreo del suelo modifica la actividad microbiana

Existen otros métodos diferentes a la utilización de sustratos carbonados en microplacas, que permiten una evaluación más integral de la actividad microbiana. Si bien no existe un parámetro ideal, la utilización de varias metodologías complementarias permite una mejor caracterización de las comunidades microbianas desde el punto de vista funcional. La actividad evaluada con el método de hidrólisis de diacetato de fluoresceína (HFDA) es un indicador de la actividad hidrolítica global conjunta de distintas enzimas como esterasas, lipasas y glucosidasas (Green y col., 2006; Zuber y Villamil, 2016). La mayor actividad hidrolítica del HFDA en post-cosecha que en pre-cosecha en suelos bajo SD en comparación con los valores bajos obtenidos en el suelo bajo LC sugiere la presencia de comunidades microbianas más numerosas y/o más activas bajo SD. La interpretación más probable es el estímulo del crecimiento microbiano debido al rastrojo del cultivo cosechado. Zuber y Villamil (2016) presentaron una compilación de resultados similares en un meta-análisis recientemente publicado. Estos autores atribuyeron la mayor actividad en SD a una mayor diversidad funcional en los suelos sin laboreo. Por otra parte, no encontraron diferencias en actividad entre LC y LV, concluyendo que es el laboreo del suelo el que reduce la actividad microbiana, sin importar el implemento con el que el mismo se realice. En nuestro caso, las comunidades del suelo bajo LV, tal como sucedió con otras mediciones, presentaron valores de actividad similares a los de SD en algunos bloques y en otros a los de LC. Otros autores (Meriles y col., 2009; Perez-Brandán y col., 2012) encontraron resultados similares, observando una mayor biomasa microbiana, diversidad y actividad en suelos bajo SD que en suelos bajo laboreo. De los parámetros evaluados en este estudio no podemos atribuir esta mayor actividad en SD a una mayor diversidad funcional, o a una mayor diversidad genética bacteriana, y tampoco a una mayor abundancia de bacterias. Lo que fue claramente distinto entre SD y LC fue la composición de las comunidades de bacterias de estos suelos y esa diferencia estructural, en parte, podría contribuir a las diferencias observadas a nivel de la actividad (Fierer y col., 2012). Por otro lado, anteriormente habíamos mencionado la relevancia de los hongos en post-cosecha y existen indicios de diferencias estructurales de este grupo microbiano entre suelos con SD y suelos laboreados (Vargas Gil y col., 2011). En nuestro caso, observamos que la abundancia de bacterias se redujo en post-cosecha, y habíamos atribuido este resultado a un incremento en las poblaciones fúngicas. Esto podría ser la causa de una mayor actividad enzimática, ya que la metodología HFDA evalúa tanto enzimas intracelulares como las extracelulares sin discriminar de qué grupo microbiano provienen. En apoyo a esta hipótesis observamos un incremento en la actividad de pre- a post-cosecha, este incremento es una clara respuesta de las comunidades a los restos vegetales que se aportan al suelo luego de la cosecha. Otra observación importante es la dinámica opuesta de la actividad microbiana evaluada como PDC y como HFDA. Mientras la primera variable disminuye de pre- a post-cosecha la segunda incrementa. A su vez observamos una disminución en la abundancia de bacterias entre pre- y post-cosecha, que son los principales microorganismos que se manifiestan en las microplacas y cuya actividad expresamos como PDC. Estas observaciones en conjunto, apoyan la hipótesis de que los microorganismos que dominan la actividad microbiana en la etapa de post-cosecha serían los hongos (Schneider y col., 2012) y no las bacterias, las cuales en su mayoría

son microorganismos de rápido crecimiento, más favorecidas en la etapa de pre-cosecha.

La degradación de rastrojos solamente se evaluó en post-cosecha, que es el momento de mayor presencia de restos vegetales y respetando el rastrojo del cultivo antecesor. Este diseño permitió poner a prueba la actividad degradadora de las comunidades microbianas frente a dos rastrojos de calidades diferentes. El rastrojo de maíz, comparativamente más recalcitrante, es el que permitió diferenciar entre las comunidades de los suelos con los manejos de labranza más contrastantes, y poner de manifiesto una menor actividad de las comunidades bajo LC. Sin embargo, frente al rastrojo de soja, comparativamente más lábil, las comunidades bajo LC no fueron menos activas que bajo SD, sino que los valores de actividad fueron similares en los suelos con estos dos manejos. Ya hemos discutido el rol de los hongos en la degradación de los compuestos complejos del rastrojo, y estos son más favorecidos por la ausencia de laboreo (Perez-Brandán y col., 2012; van Capelle y col., 2012) y de ello se desprende una mayor actividad en suelos con SD observada con el empleo de rastrojo de maíz. Para poner a prueba esta hipótesis se requiere de una investigación que incluya la evaluación de las comunidades fúngicas. A pesar de los numerosos estudios que se realizaron sobre el experimento de larga duración de la EEA Gral. Villegas éstos se centraron en la evaluación de las propiedades del suelo y de los rendimientos de los cultivos, y de los pocos relacionados con las comunidades microbianas de estos suelos, hasta ahora, ninguno evaluó la diversidad taxonómica y funcional de la comunidad fúngica.

4.6. Los tipos de laboreo producen cambios en la estructura de la comunidad de desnitrificadores

La complejidad inherente de los procesos microbianos del suelo determina que la evaluación de los tratamientos se enfoque en grupos funcionales particulares, además de los estudios de aspectos más globales. En nuestro caso decidimos estudiar los efectos de los tratamientos sobre la desnitrificación, un proceso de importancia para el ciclado de nitrógeno en el suelo. Una enzima clave de la desnitrificación es la nitrito reductasa. Esta enzima cuenta con dos variantes funcionalmente redundantes (Jones y Hallin, 2010) que son codificadas por dos genes diferentes (*nirK* y *nirS*) y excluyentes; es decir, un genoma dado contiene sólo un tipo de estos genes (Jones y col., 2008). La abundancia de cada uno de los miembros de esta comunidad funcional en los diferentes ambientes se asocia con la preferencia de diferentes nichos por parte de los microorganismos involucrados (Jones y Hallin, 2010). De esta manera, la evaluación del cociente del número de copias de ambos genes permite inferir cambios en las condiciones micro-ambientales de un suelo. Además, conociendo la abundancia de estos genes podríamos realizar una estimación aproximada del potencial de desnitrificación de una comunidad microbiana en particular. En varios trabajos se logró asociar los genes *nirK* y *nirS* (Graham y Haynes, 2005; Chroňáková y col., 2009; Philippot y col., 2009; Cuhel y col., 2010; Morales y col., 2010) con la importancia relativa de diferentes parámetros del proceso de desnitrificación. No obstante, es importante resaltar que este vínculo aún permanece poco claro ya que no siempre existe correlación entre las tasas o

emisiones de gases (N_2 , NO y N_2O) y la abundancia de estos genes (Henderson y col., 2010; Rosa y col., 2014), debido en parte a las dificultades en la medición de las emisiones de los gases involucrados.

El número de copias del gen *nirK* superó al del gen *nirS* en cuatro veces en maíz y tres veces en soja, aproximadamente, en los tres momentos de la secuencia agronómica evaluada. Esta relación se ha visto que no es uniforme en los ecosistemas, en algunos casos se reportó que el número de copias de *nirK* supera al de *nirS* (Yoshida y col., 2009; Jones y Hallin, 2010; Bannert y col., 2011; Rosa y col., 2014) y en otros ocurrió lo contrario (Bothe y col., 2000; Kandeler y col., 2006; Geets y col., 2007). Estos dos genes no se comportaron de la misma manera frente a los tratamientos de labranza, siendo el gen *nirS* el más fuertemente influenciado por los manejos y, además, mostrando ambos un comportamiento opuesto. Existen antecedentes en la bibliografía que coinciden con nuestros resultados, observando un incremento del número de copias del gen *nirS* en los manejos menos conservacionistas. Por ejemplo, en la Región Pampeana Rosa y colaboradores (2014), encontraron un mayor número de copias de *nirS* en suelos sometidos a “malas prácticas agrícolas”, definidas como manejos no sustentables de monocultivo sin laboreo con bajos aportes de nutrientes y elevado uso de agroquímicos. Jones y Hallin (2010) reportaron una mayor selectividad de hábitats por parte de los microorganismos que portan el gen *nirK*, y esto explica la disminución del número de copias de este gen en LV y en mayor medida en LC. Este efecto negativo del laboreo también dependió del cultivo, observándose una disminución de la abundancia del gen *nirK* en soja pero no en maíz. A pesar de que la abundancia del gen *nirK* fue dependiente del cultivo, observamos un incremento en la relación *nirS/nirK* en LC en ambos cultivos, siendo el incremento de la abundancia de *nirS* lo suficientemente fuerte para reflejarse en la composición de este grupo funcional bacteriano. En este sentido, Kong y colaboradores (2010) sostienen que el contenido de carbono podría tener una importante influencia sobre la estructura de los desnitrificadores. Sin embargo, en nuestro caso, no detectamos cambios en los contenidos de carbono que pudieran acompañar a los cambios observados en la estructura de este grupo particular de desnitrificadores. Una explicación posible es que la respuesta de las comunidades microbianas sea más temprana, de modo que los cambios en los genes se anticipen a los que se detectan por métodos tradicionales de evaluación del contenido de carbono. De hecho, cuando construimos un modelo estadístico para relacionar las abundancias relativas de los dos genes en función de los parámetros de fertilidad físico-química observamos asociaciones significativas. En lotes de soja el gen *nirK* mostró dependencia con respecto al porcentaje de materia orgánica y a los contenidos de arcilla. Es sabido que ambos factores están emparentados, y que incrementos en el contenido de arcilla en suelos de textura gruesa pueden llevar a una mayor protección de la materia orgánica y por ende a un mayor secuestro de la misma en el suelo. En contraste, en lotes de maíz la cantidad de copias del gen *nirS* estuvo negativamente asociada a la relación C/N y positivamente a los contenidos de limo. Este resultado sugiere un incremento poblacional de los portadores del gen *nirS* en ambientes relativamente más pobres en carbono. Esta respuesta también apoya a la hipótesis de que los microorganismos de tipo *nirS* estarían adaptados a ambientes con mayor deterioro. Ambos modelos apoyan las observaciones y postulados de Kong y colaboradores (2010) quienes postulan que el contenido de carbono es un importante factor que modula la composición de la comunidad de desnitrificadores, aun cuando no se detecten diferencias en el estatus nutricional de los suelos. Otro aspecto a destacar es que los modelos de respuesta a los parámetros de fertilidad desarrollados para ambos genes explicaron un 54% de variabilidad para *nirS* en soja y un 63% para *nirK* en maíz. Esto significa que la

respuesta de los genes es más compleja y que existen otros factores que modularían su comportamiento, los cuales no fueron contemplados en este estudio. A fin de lograr una comprensión integral del problema debería sumarse en el análisis algún parámetro indicador del grado de compactación del suelo, por ejemplo, la densidad aparente. En cuanto a la dinámica a lo largo de las tres etapas de la secuencia agronómica ambos genes nuevamente se comportaron de manera diferente. Esta vez el gen *nirS* no mostró sensibilidad temporal mientras el gen *nirK* sí, incrementando el número de copias en barbecho con antecesor soja. De todos modos, este incremento no alteró de manera sustancial la relación entre ambos genes. Una posible causa del incremento observado puede ser la respuesta al rastrojo de soja, rico en nitrógeno y más lábil que el de maíz. Sin embargo, se requiere un estudio más detallado para evaluar la certeza de esta hipótesis.

4.7. Consideraciones finales

La SD es conocida como un manejo conservacionista, sin embargo, no puede generalizarse para todas las condiciones de suelo. El secuestro de carbono en los suelos manejados con SD va a depender en gran medida del escenario en el que este paquete tecnológico se implemente. En nuestro caso después de 22 años no se observó una mejora en el estatus nutricional de estos suelos, no difiriendo ni los contenidos de carbono ni los de nitrógeno entre los tres tratamientos de labranza. Sin embargo, observamos las primeras señales de una respuesta microbiana, a pesar de no detectar cambios utilizando las metodologías tradicionales de análisis. Esto es debido a la sensibilidad de las comunidades microbianas y su temprana e integrada respuesta a cambios más sutiles (Bastida y col., 2008, Cavagnaro y col., 2008; Ritz y col., 2009; Bissett y col., 2013). Los efectos diferenciales de los manejos sobre las comunidades microbianas no se reflejaron en todas las características evaluadas. Dado que no existe un método perfecto que nos provea de la totalidad de la información requerida para el estudio de las comunidades microbianas, aplicamos varias metodologías que estudian grupos funcionales relevantes para diferentes procesos del suelo. Esta es la razón por la que los resultados obtenidos con cada una de las metodologías usadas pueden discrepar. Teniendo en cuenta las limitaciones y las ventajas de cada metodología de estudio se puede llegar a conclusiones aproximadas, pero siempre surgen nuevas preguntas a responder que requerirían de estudios más puntuales. Los trabajos como el nuestro, generan información valiosa que puede ser la base de investigaciones futuras, con métodos que permitan una mayor resolución y permitan responder a las preguntas nuevas y puntuales que surgen de este trabajo.

Capítulo 5

CONCLUSIONES

El objetivo principal de este trabajo fue evaluar de qué manera los diferentes manejos, tales como la labranza y la fertilización, en un contexto de rotación de cultivos, afectan a las comunidades microbianas en un experimento de larga duración. La posibilidad de trabajar en un experimento de larga duración determina que se puedan realizar estudios bajo condiciones controladas del manejo agrícola, y así minimizar la presencia de factores que introducen ruido experimental al evaluar campos en producción. En este caso, se mantuvieron durante 22 años manejos de labranza convencional, vertical o siembra directa y 12 años con o sin fertilización con fosfato mono-amónico.

Los impactos de los manejos se evaluaron mediante diferentes metodologías, lo que permitió analizar diversos aspectos de las comunidades microbianas: la estructura y la abundancia de bacterias, los perfiles fisiológicos de utilización de diferentes sustratos carbonados, la actividad microbiana y la abundancia de un grupo particular de bacterias desnitrificadoras. Las evaluaciones se realizaron en tres momentos de la secuencia agronómica: pre-cosecha, post-cosecha y barbecho que difieren en la calidad y volumen de los principales aportes de carbono y nutrientes para las comunidades microbianas del suelo. A través de esta variación pudimos también evaluar la respuesta dinámica de las comunidades microbianas en un contexto de secuencia agronómica. Por otro lado, dada la estrecha relación entre las comunidades microbianas y los parámetros de fertilidad físico-química del suelo, se realizaron evaluaciones de varios parámetros de relevancia.

Los mayores contrastes a nivel de las comunidades microbianas los observamos entre los microorganismos de lotes bajo siembra directa (SD) y aquellos bajo labranza convencional (LC). Los suelos bajo labranza vertical (LV) no respondieron de manera intermedia, como habíamos esperado, sino que mostraron un comportamiento oscilante pareciéndose ocasionalmente a los suelos bajo SD o bajo LC.

De la manera que habíamos propuesto, observamos impactos de los tratamientos de labranza en la estructura de bacterias y en los parámetros de actividad siendo la composición de las comunidades en SD claramente diferentes de las de LC, independientemente del cultivo y de la etapa agronómica en la cual fueron tomadas las muestras. También observamos comunidades más activas en suelos bajo SD que bajo LC. Finalmente, detectamos cambios en la composición de la comunidad de bacterias desnitrificadoras a nivel de dos genes que codifican dos variantes de la enzima nitrito reductasa. Estos cambios fueron dados principalmente por el incremento de la población portadora de genes *nirS* en manejos menos conservacionistas en ambos cultivos, y una disminución de la población *nirK* sólo en soja.

A pesar de los 22 años de manejos de labranza diferentes, curiosamente no observamos diferencias para todos los parámetros biológicos medidos, incluyendo algunos que permiten evaluar actividad microbiana. Por ejemplo, no encontramos diferencias en las abundancias de bacterias entre los tratamientos de labranza, en los perfiles fisiológicos de uso de sustratos carbonados, ni en los índices de diversidad genética y metabólica. Sin embargo, estas ausencias de respuesta de algunos de los parámetros microbiológicos se deben ubicar en el contexto de las condiciones de fertilidad de los suelos. El único parámetro físico-químico del suelo que muestra diferencia entre laboreos es el contenido de arcilla, que es algo mayor en siembra directa. El contenido de fósforo extractable es mayor en los lotes fertilizados, pero en ningún caso los niveles de fósforo estuvieron en el rango de deficiencia. Sin embargo, los cultivos respondieron efectivamente al agregado de fertilizante, con rendimientos mayores, aunque estas diferencias no en todos los casos fueron estadísticamente significativas. Contrario a los rendimientos de los cultivos, ninguno de los parámetros

microbiológicos respondió al agregado de fertilizante. De este modo se puede pensar que los 22 años de diferentes manejos de labranza y 10 años de fertilización todavía no causaron cambios extensivos en los suelos para que las respuestas derivadas de estos cambios sean lo suficientemente consistentes. De ser así, se destaca la sensibilidad de algunas metodologías microbiológicas empleadas en este estudio, por ejemplo el análisis de la estructura de bacterias por DGGE o el análisis del número de copias de los genes *nirK* y *nirS*, que permitieron detectar cambios profundos a nivel de las comunidades bacterianas del suelo. Por otro lado, algunos de los aspectos que evaluamos mostraron una importante variación temporal, independientemente de su respuesta a los tratamientos de labranza o fertilización. Estas variaciones sugieren que la planificación del ensayo y de los muestreos fue acertada para permitir detectar cambios en las comunidades microbianas en las diferentes etapas de una secuencia agronómica.

Por último, y contrario a las hipótesis propuestas en este trabajo, fue la ausencia de diferencias entre los lotes con y sin fertilización. Si bien, luego de 12 años de aplicación anual de fosfato-amónico los contenidos de fósforo en lotes fertilizados fueron altos, los contenidos de nitrógeno total no sufrieron cambios. Dadas las diferencias en fósforo extractable, fue inesperado no observar efectos de la fertilización sobre ninguno de los aspectos estudiados de las comunidades microbianas. Suponemos que esta falta de respuesta se debe a que existieron otras limitantes que no permitieron que las comunidades microbianas pudieran manifestar su potencial frente a mayores contenidos de fósforo del suelo.

Uno de los aspectos interesantes para continuar este estudio sería identificar taxonómicamente qué grupos microbianos funcionales son dominantes en cada etapa del ciclo agronómico. Esto podría lograrse empleando metodologías de secuenciación de ADN de última generación, las cuales permiten una gran profundidad de análisis a relativamente bajo costo. También deberían caracterizarse las comunidades fúngicas, ya que cumplen roles muy importantes en la descomposición del rastrojo y son frecuentemente afectadas por el laboreo. Otro aspecto a enfocar en futuros estudios es comprender mejor el efecto de la labranza vertical, y para ello sería necesario identificar con exactitud las líneas de pasada del implemento del cincel y las zonas entre las pasadas. Con esto podríamos poner a prueba la hipótesis de que la alternancia de líneas donde pasa el cincel con aquellas donde no pasa es la razón de la respuesta inconsistente de las comunidades microbianas en suelos con LV y que en ocasiones se parezca a uno u otro tipo de las otras dos labranzas. La oportunidad de seguir trabajando en este ensayo a futuro permitiría una evaluación de los diferentes tratamientos de labranza con mayor cantidad de años y un mayor contraste en las condiciones del suelo, así como detectar efectos de la fertilización cuando las deficiencias de fósforo empiecen a manifestarse en los suelos no fertilizados.

Capítulo 6

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abril A, Caucás V, Vázquez FN (1995) Sistemas de labranza y dinámica microbiana del suelo en la región central de la provincia de Córdoba (Argentina). *Ciencia del suelo*, 13, 104-106.

Álvarez C, Mulin E (2004) El gran libro de la siembra directa. Editorial Clarín y Facultad de Agronomía, UBA, Buenos Aires.

Alvarez C, Peinemann N, Quiroga A (2006) Sistemas de labranza, propiedades edáficas y rendimiento de maíz en Molisoles diferenciados por el régimen hídrico. *Publicación Técnica INTA*, 67, 1-10.

Álvarez R (2001) Estimation of carbon losses by cultivation from soils of the Argentine Pampa using the Century model. *Soil Use and Management*, 17(2), 62-66.

Álvarez R, Santanatoglia OJ, García R (1995) Soil respiration and carbon inputs from crops in a wheat–soybean rotation under different tillage systems. *Soil Use and Management*, 11, 45–50.

Álvarez R, Steinbach HS (2009) A review of the effects of tillage systems on some soil physical properties, water content, nitrate availability and crops yield in the Argentine Pampas. *Soil and Tillage Research*, 104(1), 1-15.

Amiotti N, Villamil MB, Darmony RG (2012) Agronomic and taxonomic consequences of agricultural use of marginal soils in Argentina. *Soil Science Society of America Journal*, 76, 558-568.

Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 233-266.

Bannert A, Kleinedam K, Wissing L, Mueller-Niggemann C, Vogelsang V, Welzl G, Schlöter M (2011) Changes in diversity and functional gene abundances of microbial communities involved in nitrogen fixation, nitrification, and denitrification in a tidal wetland versus paddy soils cultivated for different time periods. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(17), 6109-6116.

Barraco M, Alvarez C, Díaz-Zorita M (2004) Ensayo de labranzas de larga duración en un hapludol del Noroeste bonaerense: efectos en el suelo y los rendimientos de maíz y soja. *Publicación Técnica INTA*, 40, 1-17.

Barraco M, Alvarez C, Díaz-Zorita M, Scianca C (2006) Efecto de la fertilización fosfatada y sistemas de labranza en la producción de soja. *Memoria Técnica INTA*, 2005-2006, 42-44.

Bastida F, Zsolnay A, Hernández T, García C (2008) Past, present and future of soil quality indices: A biological perspective. *Geoderma*, 147, 159-171.

Bending GD, Turner MK, Jones JE (2002) Interactions between crop residue and soil organic matter quality and the functional diversity of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(8), 1073-1082.

Bent SJ, Forney LJ (2008) The tragedy of the uncommon: understanding limitations in the analysis of microbial diversity. *The ISME Journal*, 2(7), 689-695.

Berg G, Smalla K (2009) Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS microbiology ecology*, 68(1), 1-13.

Bisset A, Richardson AE, Baker G, Thrall PH (2011) Long-term land use effects on soil microbial community structure and function. *Applied Soil Ecology*, 51, 66-78.

Bissett A, Richardson AE, Baker G, Kirkegaard J, Thrall PH (2013) Bacterial community response to tillage and nutrient additions in a long-term wheat cropping experiment. *Soil Biology and Biochemistry*, 58, 281-292.

Bodelier P (2011) Toward understanding, managing, and protecting microbial ecosystems. *Frontiers in Microbiology*, 2, 80.

Bossio DA, Scow KM, Gunapala N, Graham KJ (1998) Determinants of soil microbial communities: effects of agricultural management, season, and soil type on phospholipid fatty acid profiles. *Microbial ecology*, 36(1), 1-12.

Bothe H, Jost G, Schlöter M, Ward BB, Witzel KP (2000) Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 673-690.

Brajesh KS, Tate K, Thomas N, Ross D, Singh J (2011) Differential effect of afforestation on nitrogen-fixing and denitrifying communities and potential implications for nitrogen cycling. *Soil Biology and Biochemistry*, 43: 1426-1433.

Bremner JM (1960) Determination of nitrogen in soil by the Kjeldahl method. *The Journal of Agricultural Science*, 55(1), 11-33.

Bünemann EK, Prusisz B, Ehlers K (2011) Characterization of phosphorus forms in soil microorganisms. En 'Phosphorus in Action'. (Springer Berlin Heidelberg: Berlin), 2011. p. 37-57.

Campbell CD, Grayston SJ, Hirst DJ (1997) Use of rhizosphere carbon sources in sole carbon source tests to discriminate soil microbial communities. *Journal of Microbiological Methods*, 30(1), 33-41.

Campillo R y Sadzawka A (2006) La acidificación de los suelos. Origen y mecanismos involucrados. *Serie Actas Instituto de Investigaciones Agropecuarias*, 38: p. 44-60.

Carbonetto B, Rascovan N, Álvarez R, Mentaberry A, Vázquez MP (2014) Structure, composition and metagenomic profile of soil microbiomes associated to agricultural land use and tillage systems in Argentine Pampas. *PloS One*, 9(6), e99949.

Cavagnaro TR, Jackson LE, Hristova K, Scow KM (2008) Short-term population dynamics of ammonia oxidizing bacteria in an agricultural soil. *Applied Soil Ecology*, 40, 13-18.

Chen Z, Luo X, Hu R, Wu M, Wu J, Wei W (2010) Impact of long-term fertilization on the composition of denitrifier communities based on nitrite reductase analyses in a paddy soil. *Microbial Ecology*, 60(4), 850-861.

Chroňáková A, Radl V, Čuhel J, Šimek M, Elhottová D, Engel M, Schlöter M (2009) Overwintering management on upland pasture causes shifts in an abundance of denitrifying microbial communities, their activity and N₂O-reducing ability. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(6), 1132-1138.

Coelho MRR, Marriel IE, Jenkins SN, Lanyon CV, Seldin L, O'Donnell AG (2009) Molecular detection and quantification of nifH gene sequences in the rhizosphere of sorghum (*Sorghum bicolor*) sown with two levels of nitrogen fertilizer. *Applied Soil Ecology*, 42 (1), 48-53.

Cookson WR, Murphy DV, Roper MM (2008) Characterizing the relationships between soil organic matter components and microbial function and composition along a tillage disturbance gradient. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(3), 763-777.

Correa OS, Romero AM, Montecchia MS, Soria MA (2007) Tomato genotype and *Azospirillum* inoculation modulate the changes in bacterial communities associated with roots and leaves. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 781-786.

Correa OS (2013) Los microorganismos del suelo y su rol indiscutido en la nutrición vegetal. En 'Aportes de la microbiología a la producción de cultivos: tercera jornada del Instituto de Investigaciones en Biociencias Agrícolas y Ambientales' (Eds M Díaz-Zorita, OS Correa, MV Fernandez-Canigia, RS Lavado) (Editorial FAUBA: Buenos Aires, Argentina). 220 pp. ISBN 978-987-29338-2-1.

Correa OS, Chiocchio VM, Montecchia MS, Tosi M, Fernandez Di Pardo A, Simonetti E, Spagnoletti F, Sydorenko O, Vogrig J (2013) Microorganismos nativos para una gestión sustentable de los ecosistemas terrestres. En 'Microbiología agrícola: un aporte de la investigación en la Argentina' (Ed A Albanesi) (Magna: Tucumán) 489 pp. ISBN 978-987-1726-17-2.

Cosentino D (2015) Valores orientativos para el análisis de planillas de suelos argentinos. En 'Prácticas edafológicas con fines didácticos' (Ed D Cosentino) (Editorial FAUBA, Buenos Aires) 268 pp.

Cuhel J, Simek M, Laughlin RJ, Bru D, Cheneby D, Watson CJ, Philippot L (2010) Insights into the effect of soil pH on N₂O and N₂ emissions and denitrifier community size and activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(6), 1870-1878.

Debosz K, Rasmussen PH, Pedersen AR (1999) Temporal variations in microbial biomass C and cellulolytic enzyme activity in arable soils: effects of organic matter input. *Applied Soil Ecology*, 13(3), 209-218.

Díaz-Zorita M, Barraco M, Alvarez C (2004) Efectos de doce años de labranzas en un Hapludol del Noroeste de Buenos Aires, Argentina. *Ciencia del Suelo*, 22(1), 11-18.

Díaz-Zorita M, Basanta M (1999) Efectos de seis años de labranzas en un Hapludol del noroeste de Buenos Aires, Argentina. *Ciencia del Suelo*, 17(1), 31-36.

Díaz-Zorita M, Duarte GA, Fernandez Canigia MV (2000) La siembra directa y los sistemas mixtos de producción en el oeste de Buenos Aires. INTA. Publicación técnica INTA, 33.

Diosma G, Balatti PA (1998) Actividad microbiana y número de nitrificadores y celulolíticos en un suelo cultivado con trigo bajo distintos sistemas de labranza. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 103.

Elfstrand S, Hedlund K, Mårtensson A (2007) Soil enzyme activities, microbial community composition and function after 47 years of continuous green manuring. *Applied Soil Ecology*, 35(3), 610-621.

Feng Y, Motta AC, Reeves DW, Burmester CH, Van Santen E, Osborne JA (2003) Soil microbial communities under conventional-till and no-till continuous cotton systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(12), 1693-1703.

Fernández-Canigia MV, Díaz-Zorita M (1999) Áreas homogéneas de producción agrícola en el este de la provincia de La Pampa. *Revista de la Facultad de Agronomía de La Pampa*, 10, 65-74.

Fierer N, Jackson JA, Vilgalys R, Jackson RB (2005) Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 4117–4120.

Fierer N, Lauber CL, Ramirez KS, Zaneveld J, Bradford MA, Knight R (2012) Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. *The ISME Journal*, 6: 1007-1017.

Figuerola EL, Guerrero, LD, Türkowsky D, Wall LG, Erijman L (2015) Crop monoculture rather than agriculture reduces the spatial turnover of soil bacterial communities at a regional scale. *Environmental Microbiology*, 17(3), 678-688.

Fukami T, Dickie IA, Wilkie JP, Paulus BC, Park D, Roberts A, Buchanan PK, Allen RB (2010) Assembly history dictates ecosystem functioning: evidence from wood decomposer communities. *Ecology Letters*, 13, 675-684.

Galantini JA, Iglesias JO, Maneiro C, Kleine C (2007) Efectos de largo plazo sobre la materia orgánica del suelo. Rev. Técnica Especial en SD, AAPRESID, Octubre, 11-15.

Garland J, Mills A (1991) Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 2351-2359.

Geets J, De Cooman M, Wittebolle L, Heylen K, Vanparys B, De Vos P, Boon N (2007) Real-time PCR assay for the simultaneous quantification of nitrifying and denitrifying bacteria in activated sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(1), 211-221.

Gomez E, Garland J, Conti M (2004) Reproducibility in the response of soil bacterial community level physiological profiles from a land use intensification gradient. *Applied Soil Ecology*, 26, 21-30.

Graham MH, Haynes RJ (2005) Catabolic diversity of soil microbial communities under sugarcane and other land uses estimated by BIOLOGTM and substrate-induced respirations methods. *Applied Soil Ecology*, 29, 155-164.

Graham DW, Trippett C, Dodds WK, O'Brien JM, Banner EB, Head IM, Knapp CW (2010) Correlations between *in situ* denitrification activity and *nir*-gene abundances in pristine and impacted prairie streams. *Environmental Pollution*, 158(10), 3225-3229.

Green V, Stot D, Diack M (2006) Assay for fluoresceinediacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples. *Soil Biology and Biochemistry*, 38, 693-701.

Hallin S, Jones, CM, Schlöter M, Philippot L (2009) Relationship between N-cycling communities and ecosystem functioning in a 50-year-old fertilization experiment. *The ISME Journal*, 3(5), 597-605.

Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1), 9p.

Handcock MS, Gile KJ, Fellows IE, Neely WW (2016) R Development Core Team. 2014. Package RDS.

Hayden HL, Drake J, Imhof M, Oxley APA, Norng S, Mele PM (2010) The abundance of nitrogen cycle genes *amoA* and *nifH* depends on land-uses and soil types in South-Eastern Australia. *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 1774-1783.

Helgason BL, Walley FL, Germida JJ (2010) Long-term no-till management affects microbial biomass but not community composition in Canadian prairie agroecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(12), 2192-2202.

Henderson SL, Dandie CE, Patten CL, Zebarth BJ, Burton, DL, Trevors, JT, Goyer C (2010) Changes in denitrifier abundance, denitrification gene mRNA levels, nitrous oxide emissions, and denitrification in anoxic soil microcosms amended with glucose and plant residues. *Applied Environmental Microbiology*, 76(7), 2155-2164.

Henry S, Baudoin E, López-Gutiérrez JC, Martin-Laurent F, Brauman A, Philippot L (2004) Quantification of denitrifying bacteria in soils by *nirK* gene targeted real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 59(3), 327-335.

Heuer H, Krsek M, Baker P, Smalla K, Wellington E (1997) Analysis of actinomycete communities by specific amplification of gene encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied Environmental Microbiology*, 63, 3233-3241.

Jackson LE, Calderon FJ, Steenwerth KL, Scow KM, Rolston DE (2003) Responses of soil microbial processes and community structure to tillage events and implications for soil. *Geoderma*, 114, 305-317.

Johnson JMF, Barbour NW, Weyers SL (2007) Chemical composition of crop biomass impacts its decomposition. *Soil Science Society of America Journal*, 71(1), 155-162.

Jones CM, Stres B, Rosenquist M, Hallin S (2008) Phylogenetic analysis of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide respiratory enzymes reveal a complex evolutionary history for denitrification. *Molecular Biology and Evolution*, 25(9), 1955-1966.

Jones CM, Hallin S (2010) Ecological and evolutionary factors underlying global and local assembly of denitrifier communities. *The ISME Journal*, 4(5), 633-64.

Kandeler E, Deiglmayr K, Tschirko D, Bru D, Philippot L (2006) Abundance of *narG*, *nirS*, *nirK*, and *nosZ* genes of denitrifying bacteria during primary successions of a glacier foreland. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 5957-5962.

Keil D, Meyer A, Berner D, Poll C, Schützenmeister A, Piepho HP, Marhan S (2011) Influence of land-use intensity on the spatial distribution of N-cycling microorganisms in grassland soils. *FEMS microbiology ecology*, 77(1), 95-106.

Kong AYY, Hristova K, Scow KM, Sixa J (2010) Impacts of different N management regimes on nitrifier and denitrifier communities and N cycling in soil microenvironments. *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 1523-1533.

Kowalchuk GA, Stephen JR (2001) Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annual Review of Microbiology*, 55, 485-529.

Kramer S, Marhan S, Haslwimmer H, Ruess L, Kandeler E (2013) Temporal variation in surface and subsoil abundance and function of the soil microbial community in an arable soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 61, 76-85.

Kuhn M, Weston S, Wing J, Forester J, Thorn T (2016) R Development Core Team. 2014. A Collection of Contrast Methods. Contrast R package version 0.21.

Kuramae E, Gamper H, van Veen J, Kowalchuk G (2011) Soil and plant factors driving the community of soil-borne microorganisms across chronosequences of secondary succession of chalk grasslands with a neutral pH. *FEMS Microbiology Ecology*, 77(2), 285-294.

Landa R (2008) Determinación de usos del suelo a través de clasificación de imágenes satelitales. Campaña de cosecha gruesa 2007-2008 en el área de la EEA General Villegas. *Memoria Técnica INTA 2007-2008*, pp.109-112, ISSN 1850-6038.

Liu Y, Shi G, Mao L, Cheng G, Jiang S, Ma X, Feng H (2012) Direct and indirect influences of 8 yr of nitrogen and phosphorus fertilization on *Glomeromycota* in an alpine meadow ecosystem. *New Phytologist*, 194(2), 523-535.

Lupwayi NZ, Rice WA, Clayton GW (1998) Soil microbial diversity and community structure under wheat as influenced by tillage and crop rotation. *Soil Biology and Biochemistry*, 30, 1733-1741.

Massey PA, Creamer RE, Whelan MJ, Ritz K (2016) Insensitivity of soil biological communities to phosphorus fertilization in intensively managed grassland systems. *Grass and Forage Science*, 71(1), 139-152.

Mathew PR, Feng Y, Githinji L, Ankumah R, Balkcom KS (2012) Impact of no-tillage and conventional tillage systems on soil microbial communities. *Applied and Environmental Soil Science*, 2012.

McDaniel MD, Tiemann LK, Grandy AS (2014) Does agricultural crop diversity enhance soil microbial biomass and organic matter dynamics? A meta-analysis. *Ecological Applications*, 24(3), 560-570.

Meriles JM, Gil SV, Conforto C, Fighi G, Lovera E, March GJ, Guzmán CA (2009) Soil microbial communities under different soybean cropping systems: Characterization of microbial population dynamics, soil microbial activity, microbial biomass, and fatty acid profiles. *Soil and Tillage Research*, 103(2), 271-281.

Montecchia MS, Correa OS, Soria MA, Frey SD, Garcia AF, Garland JL (2011) Multivariate approach to characterizing soil microbial communities in pristine and agricultural sites in Northwest Argentina. *Applied Soil Ecology*, 47, 176-183.

Montecchia MS, Tosi M, Soria MA, Vogrig JA, Sydorenko O, Correa OS (2015) Pyrosequencing reveals changes in soil bacterial communities after conversion of Yungas forests to agriculture. *PloS One*, 10(3), e0119426.

Morales SE, Cosart T, Holben WE (2010) Bacterial gene abundances as indicators of greenhouse gas emission in soils. *The ISME Journal*, 4, 799-808.

Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology*, 59, 695-700.

Mulder CPH, Uliassi DD, Doak DF (2001) Physical stress and diversity-productivity relationships: the role of positive interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(12), 6704-6708.

Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini MT (2003) Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54, 655-670.

Navarro-Noya YE, Gómez-Acata S, Montoya-Ciriaco N, Rojas-Valdez A, Suárez-Arriaga MC, Valenzuela-Encinas C, Dendooven L (2013) Relative impacts of tillage, residue management and crop-rotation on soil bacterial communities in a semi-arid agroecosystem. *Soil Biology and Biochemistry*, 65, 86-95.

Ng JP, Hollister EB, González-Chávez MDCA, Hons FM, Zuberer DA, Aitkenhead-Peterson JA, Gentry TJ (2012) Impacts of cropping systems and long-term tillage on soil microbial population levels and community composition in dryland agricultural setting. *ISRN Ecology*, 2012.

Oakley BB, Francis CA, Roberts KJ, Fuchsman CA, Srinivasan S, Staley JT (2007) Analysis of nitrite reductase (nirK and nirS) genes and cultivation reveal depauperate community of denitrifying bacteria in the Black Sea suboxic zone. *Environmental Microbiology*, 9(1), 118-130.

Okano Y, Hristova KR, Leutenegger CM, Jackson LE, Denison RF, Gebreyesus B, Lebauer D, Scow KM (2004) Application of real-time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), 1008-1016.

Patra AK, Abbadie L, Clays-Josserand A, Degrange V, Grayston SJ, Guillaumaud N, Loiseau P, Louault F, Mahmood S, Nazaret S, Philippot L, Poly F, Prosser JI, Roux XL (2006) Effects of management regime and plant species on the enzyme activity and genetic structure of N-fixing, denitrifying and nitrifying bacterial communities in grassland soils. *Environmental Microbiology*, 8, 1005–1016.

Peixoto RS, Coutinho HLC, Madari B, Machado PLOA, Rumjanek NG, Van Elsas JD, Rosado AS (2006) Soil aggregation and bacterial community structure as affected by tillage and cover cropping in the Brazilian Cerrados. *Soil and Tillage Research*, 90(1), 16-28.

Perez-Brandán C, Arzeno JL, Huidobro J, Grümberg B, Conforto C, Hilton S, Vargas Gil S (2012) Long-term effect of tillage systems on soil microbiological, chemical and physical parameters and the incidence of charcoal rot by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid in soybean. *Crop Protection*, 40, 73-82.

Philippot L, Spor A, Hénault C, Bru D, Bizouard F, Jones CM, Sarr A, Maron PA (2013) Loss in microbial diversity affects nitrogen cycling in soil. *ISME Journal*, 1-11.

Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D (2015) R Development Core Team. 2014. nlme: linear and nonlinear mixed effects models. R package version 3.1-117.

Pittelkow CM, Liang X, Linquist BA, Van Groenigen KJ, Lee J, Lundy ME, van Kessel C (2015) Productivity limits and potentials of the principles of conservation agriculture. *Nature*, 517(7534), 365-368.

Preston-Mafham J, Boddy L, Randerson PF (2002) Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilization profiles – a critique. *FEMS Microbiology Ecology*, 42(1), 1-14.

Rascovan N, Carbonetto B, Revale S, Reinert MD, Alvarez R, Godeas AM, Zelada AM (2013) The PAMPA datasets: a metagenomic survey of microbial communities in Argentinean pampean soils. *Microbiome*, 1(1), 21.

Ritz K, Black HJ, Campbell CD, Harris JA, Wood C (2009) Selecting biological indicators for monitoring soils: A framework for balancing scientific and technical opinion to assist policy development. *Ecological Indicators*, 9, 1212-1221.

Robinson GW (1922) A new method for the mechanical analysis of soils and other dispersions. *Journal of Agricultural Science*, 12(03), 306-321.

Rogers BF, Tate RL (2001) Temporal analysis of the soil microbial community along a toposequence in Pineland soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(10), 1389-1401.

Romaniuk R, Giuffr  L, Costantini A, Nannipieri P (2011) Assessment of soil microbial diversity measurements as indicators of soil functioning in organic and conventional horticulture systems. *Ecological Indicators*, 11(5), 1345-1353.

Rosa SM, Kraemer FB, Soria MA, Guerrero LD, Morr s HJ, Figuerola EL, Erijman L (2014) The influence of soil properties on denitrifying bacterial communities and denitrification potential in no-till production farms under contrasting management in the Argentinean Pampas. *Applied Soil Ecology*, 75, 172-180.

R sch C, Mergel A, Bothe H (2002) Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. *Applied Environmental Microbiology*, 68, 3818-3829.

Schmidt E, Amioti N (2015) Propiedades edáficas superficiales en sistemas de agricultura de conservación en la región pampeana semi rida sur. *Ciencia del Suelo* 33(1), 79-88.

Schneider T, Keiblinger KM, Schmid E, Sterflinger-Gleixner K, Ellersdorfer G, Roschitzki B, Riedel K (2012) Who is who in litter decomposition & quest; metaproteomics reveals major microbial players and their biogeochemical functions. *The ISME Journal*, 6(9), 1749-1762.

Smalla K, Wieland G, Buchner A, Zock A, Parzy J, Kaiser S, Berg G (2001) Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Applied and environmental microbiology*, 67(10), 4742-4751.

Smit E, Leeflang P, Gommans S, van den Broek J, van Mil S, Wernars K (2001) Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5), 2284-2291.

Smith JM, Ogram A (2008) Genetic and functional variation in denitrifier populations along a short-term restoration chronosequence. *Applied Environmental Microbiology*, 74(18), 5615-5620.

Smith CJ, Osborn AM (2008) Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 67, 6-20.

Sparks DL, Page AL, Helmke PA, Loeppert RH, Soltanpour PN, Tabatabai, MA, Sumner ME (1989) Methods of soil analysis. Part 3-Chemical methods. *Soil Science Society of America Inc.*

Sparks, Donald L., et al. *Methods of soil analysis. Part 3-Chemical methods.* Soil Science Society of America Inc, 1996.

Spedding TA, Hamel C, Mehuys GR, Madramootoo CA (2004) Soil microbial dynamics in maize-growing soil under different tillage and residue management systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(3), 499-512.

Strickland MS, Lauber C, Fierer N, Bradford MA (2009) Testing the functional significance of microbial community composition. *Ecology*, 90, 441-451.

Suwanwaree P, Robertson GP (2005) Methane oxidation in forest, successional, and no-till agricultural ecosystems effects of nitrogen and soil disturbance. *Soil Science Society of America Journal* 69, 1722–1729.

Suzuki MT, Taylor LT, De Long EF (2000) Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 50-nuclease assays. *Applied Environmental Microbiology*, 66, 4605-4614.

Throbäck N, Enwall K, Jarvis A, Hallin S (2004) Reassessing PCR primers targeting nirS, nirK and nosZ genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiology Ecology*, 49, 401-417.

Tosi M, Correa OS, Soria MA, Vogrig JA, Sydorenko O, Montecchia MS (2016) Land-use change affects the functionality of soil microbial communities: A chronosequence approach in the Argentinian Yungas. *Applied Soil Ecology*, 108, 118-127.

van Capelle C, Schrader S, Brunotte J (2012) Tillage-induced changes in the functional diversity of soil biota—a review with a focus on German data. *European Journal of Soil Biology*, 50, 165-181.

Vargas Gil S, Meriles J, Conforto C, Basanta M, Radl V, Hagn A, March GJ (2011) Response of soil microbial communities to different management practices in surface soils of a soybean agroecosystem in Argentina. *European Journal of Soil Biology*, 47(1), 55-60.

Vega-Avila AD, Gumiere T, Andrade PAM, Lima-Perim JE, Durrer A, Baigori M, Andreote FD (2015) Bacterial communities in the rhizosphere of *Vitis vinifera* L. cultivated under distinct agricultural practices in Argentina. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107(2), 575-588.

Vian JF, Peigne J, Chaussod R, Roger-Estrade J (2009) Effects of four tillage systems on soil structure and soil microbial biomass in organic farming. *Soil Use Manage*, 25, 1-10.

Walkley A (1947) A critical examination of a rapid method for determining organic carbon in soils-Effect of variations in digestion conditions and of inorganic soil constituents. *Soil Science*, 63(4), 251-264.

Wardle DA (1998) Controls of temporal variability of the soil microbial biomass: a global-scale synthesis. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(13), 1627-1637.

Wertz S, Degrange V, Prosser JI, Poly F, Commeaux C, Guillaumaud N, Le Roux X (2007) Decline of soil microbial diversity does not influence the resistance and resilience of key soil microbial functional groups following a model disturbance. *Environmental Microbiology*, 9, 2211–2219.

Yin C, Jones KL, Peterson DE, Garrett KA, Hulbert SH, Paulitz TC (2010) Members of soil bacterial communities sensitive to tillage and crop rotation. *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 2111-2118.

Yoshida M, Ishii S, Otsuka S, Senoo K (2009) Temporal shifts in diversity and quantity of nirS and nirK in a rice paddy field soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(10), 2044-2051.

Zak DR, Holmes WE, White DC, Peacock AD, Tilman D (2003) Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: are there any links? *Ecology*, 84, 2042-2050.

Zumft WG (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and molecular biology reviews*, 61(4), 533-616.

Zaniboni CM, Landa R (2012) Uso del suelo en el territorio agrícola ganadero del oeste bonaerense. *Memoria Técnica INTA*, 2011-2012. pp 200-206. ISSN 1850-6038.

Zuber SM, Villamil MB (2016) Meta-analysis approach to assess effect of tillage on microbial biomass and enzyme activities. *Soil Biol and Biochem*, 97, 176-187.

Apéndice 1

Ejemplos de análisis estadísticos con modelos de efectos mixtos

Cuadro A1.1: Detalles de los análisis con modelos de efectos mixtos para logaritmo decimal del número de copias de 16S bacteriano por gramo de suelo para maíz y soja en pre-cosecha, post-cosecha y barbecho:

a) Maíz, pre-cosecha (GL total =35, n=36):

	Valor	Err. Est.	GL	<i>t</i>	<i>p</i>
(Intercepto)	19,89	0,34	18,00	57,75	0,0000
labranza.SD	0,24	0,27	4,00	0,88	0,4276
labranza.LV	0,31	0,27	4,00	1,13	0,3198
fertilización.F	0,29	0,13	8,00	2,17	0,0619

b) Maíz, post-cosecha (GL total =35, n=36):

	Valor	Err. Est.	GL	<i>t</i>	<i>p</i>
(Intercepto)	8,36	0,17	18,00	49,38	0,0000
labranza.SD	0,28	0,14	4,00	1,95	0,1227
labranza.LV	0,09	0,14	4,00	0,62	0,5669
fertilización.F	-0,06	0,12	8,00	-0,54	0,6030

c) Maíz, barbecho (GL total =35, n=36):

	Valor	Err. Est.	GL	<i>t</i>	<i>p</i>
(Intercepto)	18,07	0,30	18,00	59,38	0,0000
labranza.SD	0,25	0,40	4,00	0,64	0,5563
labranza.LV	0,28	0,40	4,00	0,71	0,5175
fertilización.F	0,20	0,24	8,00	0,86	0,4134

d) Soja, pre-cosecha (GL total =35, n=36):

	Valor	Err. Est.	GL	<i>t</i>	<i>p</i>
(Intercepto)	19,78	0,45	18,00	43,61	0,0000
labranza.SD	0,35	0,20	4,00	1,73	0,1584
labranza.LV	0,16	0,20	4,00	0,80	0,4660
fertilización.F	0,35	0,16	8,00	2,11	0,0678

e) Soja, post-cosecha (GL total =35, n=36):

	Valor	Err. Est.	GL	<i>t</i>	<i>p</i>
(Intercepto)	8,19	0,12	18,00	70,19	0,0000
labranza.SD	0,15	0,13	4,00	1,16	0,3123
labranza.LV	0,07	0,13	4,00	0,52	0,6303
fertilización.F	0,01	0,11	8,00	0,09	0,9337

f) Soja, barbecho (GL total =35, n=36):

	Valor	Err. Est.	GL	<i>t</i>	<i>p</i>
(Intercepto)	18,10	0,21	18,00	85,79	0,0000
labranza.SD	0,30	0,25	4,00	1,19	0,2000
labranza.LV	0,18	0,25	4,00	0,72	0,5000
fertilización.F	-0,01	0,21	8,00	-0,09	0,9000

Cuadro A1.2: Detalles de los análisis con modelos de efectos mixtos para la variación temporal del logaritmo decimal de número de copias de 16S bacteriano por gramo de suelo para maíz y soja:

a) Maíz: (GL total =35, n=36):

	Valor	Err. Est.	GL	<i>t</i>	<i>p</i>
(Intercepto)	7,97	0,10	36,00	76,76	0,0000
etapa.POST	0,48	0,15	4,00	3,27	0,0306
etapa.PRE	0,81	0,07	35,00	11,19	0,0000

f) Soja, barbecho (GL total =35, n=36):

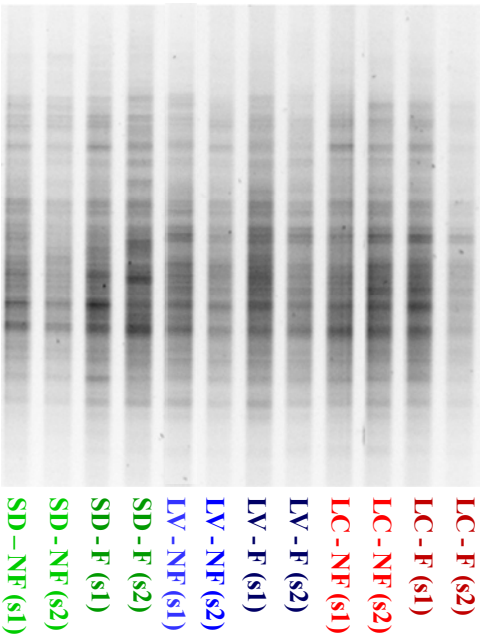
	Valor	Err. Est.	GL	<i>t</i>	<i>p</i>
(Intercepto)	7,93	0,09	36,00	87,31	0,0000
etapa.POST	0,34	0,13	4,00	2,65	0,0573
etapa.PRE	0,81	0,06	35,00	14,35	0,0000

Apéndice 2

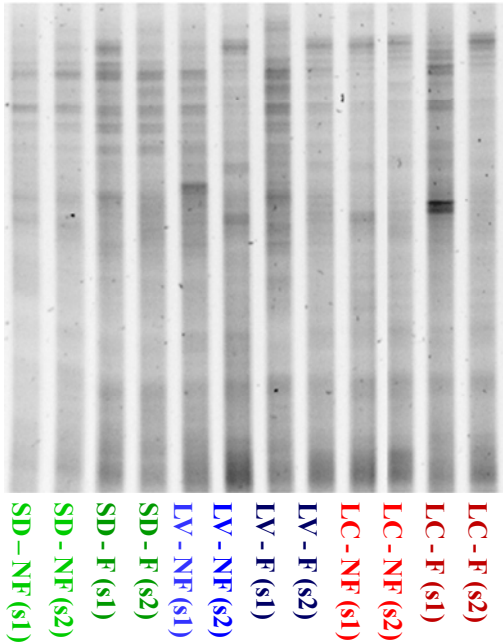
Ejemplos de imágenes de los geles de DGGE bacteriano

Figura A2.1: Detalles de algunas imágenes a partir de los geles de DGGE bacteriano. Las calles representan los perfiles de las muestras:

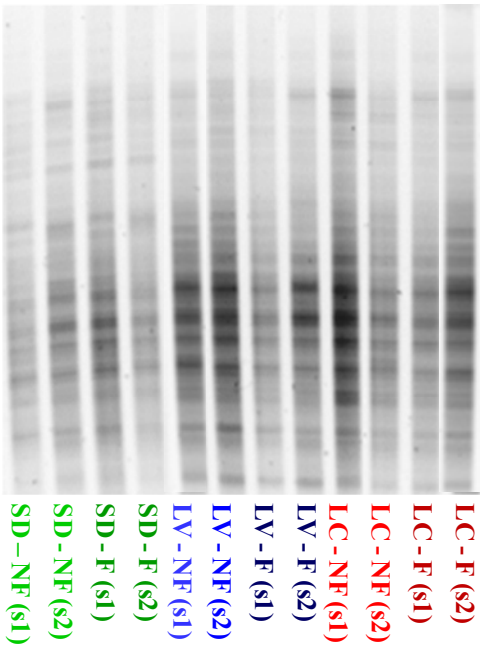
a) Soja, bloque 1 (barbecho):



b) Maíz, bloque 4 (barbecho):



c) Maíz, bloque 3 (post-cosecha):



d) Soja, bloque 6 (post-cosecha):

